Série : B
N° d'ordre : 21
N° de série : 10

THESE

PRÉSENTÉE

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES

U. E. R. DES SCIENCES BIOLOGIQUES

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR D'UNIVERSITE

PAR

Madame NGUYÊN Thi Phuong

Maitre ès Sciences
de l'Université de Strasbourg.

Influence de la castration et de la testosterone sur le developpement et sur la biosynthèse du R N A de l'adénohypophyse du rat mâle

---

Soutenue le 4 Novembre 1971 devant la Commission d'examen

M. JOUAN — *Président*

M. MANIEY

M. DUVAL — *Examinateurs*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552709_0043

Série : B
N° d'ordre : 21
N° de série : 10

THESE

PRÉSENTÉE

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES

U. E. R. DES SCIENCES BIOLOGIQUES

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR D'UNIVERSITE

PAR

Madame NGUYÊN Thi Phuong

Maître ès Sciences
de l'Université de Strasbourg.

Influence de la castration et de la testosterone sur le developpement et sur la biosynthèse du R N A de l'adénohypophyse du rat mâle

---

Soutenue le 4 Novembre 1971 devant la Commission d'examen

M. JOUAN — *Président*

M. MANIEY, M. DUVAL — *Examinateurs*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE RENNES

U.E.R. issues de la FACULTE DES SCIENCES

Doyens Honoraires

M. MILON Y.
M. TREHIN R.
M. SCHMITT M.
M. LE MOAL H.
M. MARTIN Y.
M. BOCLE J.

Professeurs Honoraires

M. FREYMANN R.
M. HAGENE P.
M. POISSON R,
M. ROHMER R.
M. TREHIN R.
M. SALMON-LEGAGNEUR F.
M. des ABBAYES H.
M. MILON Y.

Maîtres de Conférences Honoraires

M. GRILLET L.
M. LECRECQ A.

Mathématiques

Professeurs

Melle CHARPENTIER M.
M. GUERINDON J.
M. METIVIER M.
M. GIORGIUTTI I.
M. BRUNEL A.
M. TOUGERON J.C.

Maîtres de Conférences & Chargés de Cours

M. LEGOUPIL J.
M. HOUDEBINE J.
M. EUVRARD D.
M. LIEUTAUD M.
M. NEDELEC J.C.
M. VERJUS J.P.
M. TRILLING L.
M. KEANE M. (Professeur associé)
M. GILDELAMADRID (Prof. associé)

Physique

M. VACHER M.
M. VIGNERON L.
M. LE BOT J.
Mme ROBIN née SALOMOND
M. ROBIN S.
M. LE MONTAGNER S.
M. MEVEL J.Y.
M. MEINNEL J.
M. REGENSTREIF E.
M. BRUN P.
M. LE ROUX F.
M. GUIDINI
M. HAEUSLER C.
M. ARQUES P.Y.
M. DECAMPS E.
M. NUSIMOVICI M.A.

Chimie

M. VENE J.
M. LEVAS E.
M. PELTIER D.
M. PRIGENT J.
M. JOUAN P.
M. FOUCAUD A.
M. LANG J.
M, CARRIE R.
M. GUERILLOT C.
M. KERFANTO M.
M. DABARD R.

M. GRANDJEAN D.
M. LUCAS J.
M. DUVAL J.
M. TALLEC A.

Zoologie

M. RICHARD G.
M. MAILLET P.
M. BOISTEL J.
M. RAZET P.
M. FOLLIOT R.
M. ALLEGRET P.
M. MANIEY J.
M. JOLY J.
M. POSTEL (Professeur associé)

M. LEFEUVRE J.C.

Botanique

M. VILLERET S.
M. CLAUSTRES G.
Melle GOAS M.
Melle GOAS G.

Mme LEMOINE C.
M. TOUFFAIT

Géologie

M. COGNE J.
Melle DURAND S.
M. PHILIPPOT A.

M. BOILLOT G.
M. HAMEURT J.

Le Secrétaire Général de l'Université

M. BOURDIGUEL R.

- I N T R O D U C T I O N -

Il est actuellement bien établi que sous l'influence des gonado-stimulines hypophysaires, les glandes génitales des animaux secrètent leurs propres hormones qui vont à leur tour agir au niveau d'organes cibles. La secrétion des gonadotrophines est sous la dépendance des hromones sexuelles grâce à une régulation en retour par l'intermédiaire de l'hypothalamus (feed back négatif).

Un certain nombre de chercheurs ont d'abord mis en évidence l'intéraction hypophyse-gonades en étudiant les effets de l'hypophysectomie, de la castration et en injectant des hormones sexuelles aux animaux ainsi traités. L'un des premiers travaux importants est dû à FICHERA (1905) qui a comparé un certain nombre d'animaux normaux et castrés, à savoir des coqs, des taureaux, des buffles, des cobayes et des lapines. Il tire la conclusion suivante :
"L'hypophyse des animaux châtrés a un volume plus grand et pèse plus que celle "des individus entiers de la même espèce".

Jusque vers le milieu du siècle, on relève ainsi les travaux de SMITH (1926), CUTULY et collaborateurs (1938), BRINDEAU et HINGLAIS (1939), RUDOLPH et collaborateurs (1949), HINGLAIS (1950), GREEP et JONES (1950), POUMEAU de LILLE (1953).

Les expériences ont été réalisées avec des animaux d'espèces et de souches diverses, dans des conditions très variées ; les résultats sont dispersés et parfois même certains d'entre eux sont contradictoires. Les conséquences de la castration du mâle deviennent néanmoins classiques ; celle-ci provoque l'atrophie des organes génitaux accessoires (vésicules séminales, prostate et glandes préputiales) et une hypertrophie de l'adénohypophyse (DES GOUTTES, 1964).

.../...

Bien que le rôle de l'hypothalamus dans la régulation de la secrétion des gonadotrophines ait été signalé depuis de nombreuses années, ce n'est que depuis la caractérisation de certaines substances, les "releasing factors" (notamment le LRF découvert par McCANN et collaborateurs -(1960-) et le FRF par IGARASHI et McCANN -1964-) et la mise en évidence de ces RF dans le sang du système porte, que l'on a pu confirmer les interrelations du système hypothalamus-hypophyse-gonades (pour une revue générale voir Mc CANN et collaborateurs - 1968-).

L'étude précise des mécanismes moléculaires de régulation des synthèse et secrétion des gonadotrophines et du développement de l'adénohypophyse et des organes sexuels a été entreprise durant la dernière décennie. Elle se rapporte notamment à l'action des hormones sur la biosynthèse de DNA (DHOM et STÖCKER -1964-), du RNA et des protéines (pour une revue générale, voir TATA -1966-).

Nous avons, au cours de la première partie de ce travail, entrepris de déterminer l'effet de la testostérone sur des rats mâles impubères ou adultes. Notre but était d'une part de connaître d'une manière plus approfondie l'influence de la castration sur le développement de l'adénohypophyse et d'autre part l'influence de l'injection de testostérone à ces mêmes animaux castrés. Ces études correspondent à des dosages de DNA, RNA et protéines.

Dans la seconde partie de notre travail, nous nous sommes attachés à déterminer la biosynthèse in-vitro de RNA de l'adénohypophyse en utilisant un précurseur radioactif : l'acide orotique ^{14}C. Nous expliquerons dans le chapitre correspondant la raison du choix de ce précurseur. Auparavant, nous avons été amenés à comparer certains paramètres des hypophyses d'animaux normaux et castrés, à savoir le contenu en eau totale et le volume extra-cellulaire (espace inuline).

.../...

Avant d'exposer le résultat de notre travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Monsieur le professeur JOUAN qui nous a chaleureusement accueillie dans son laboratoire, et à Monsieur le professeur DUVAL qui a dirigé notre travail avec beaucoup de bienveillance.

Nos remerciements vont également à Monsieur le professeur MANIEY qui a bien voulu accepter de faire partie de notre jury.

Nous remercions Monsieur VALOTAIRE qui nous a aidé et initié aux techniques de recherche.

Nous remercions enfin tous nos amis du laboratoire qui ont manifesté beaucoup de gentillesse à notre égard, en particulier Madame SORAIS dont j'ai bénéficié de l'excellente collaboration technique.

Nous remercions vivement la Mission Culturelle des Affaires Etrangères qui, en nous attribuant une bourse de perfectionnement, nous a permis de réaliser ce travail.

PREMIERE PARTIE

EFFET DE LA TESTOSTERONE SUR LES RATS NORMAUX ET CASTRES

I - INTRODUCTION

Il est intéressant de noter que l'axe hypothalamus-hypophyse est aussi sensible chez le rat mâle que chez la femelle à l'effet feed back négatif de la testostérone (BOYD et JOHNSON, 1968) et que cet axe hypothalamus-hypophyse-testicules fonctionne déjà à la naissance (YAGINUMA et collaborateurs, 1969).

Une injection unique de testostérone (500 µg) à des rats nouveau-nés diminue le poids des testicules et des organes sexuels secondaires, l'effet de l'hormone étant plus efficace lorsque l'injection a lieu le jour même de la naissance que les 3ème ou 4ème jours (pour une revue générale, voir KURCZ et collaborateurs, 1969). L'injection d'une dose faible (inférieure à 50 µg) ne produit pas d'effet notable (SWANSON et collaborateurs, 1964). Une injection unique très forte (5 mg) 5 jours après la naissance provoque un retard temporaire de la croissance de l'adénohypophyse (JOHNSON et collaborateurs, 1964), cependant qu'une injection journalière pendant 30 jours de doses croissantes (0,5 à 2,0 mg) de testostérone à des rats nouveau-nés semble entraîner une réduction de poids de l'adénohypophyse par rapport aux animaux témoins (ARAI et MASUDA, 1968). L'injection deux fois par semaine de doses élevées (2,5 mg) d'hormone à des rats adultes ne bloque pas, par contre, le développement de l'adénohypophyse (SCHREIBER et KMENTOVA, 1965).

Etant donné la nature de ces résultats dispersés dont certains semblent de plus contradictoires, nous nous sommes attachés à déterminer les effets de la testostérone sur le développement de l'adénohypophyse de rats normaux, les injections ayant lieu soit à partir d'un âge de 4 jours, soit à partir de 23 jours, âge pour lequel on observe un développement rapide de la glande.

.../...

Nous avons également estimé l'influence de la castration (animaux opérés entre 21 et 25 jours) et de l'injection de propionate de testostérone à ces rats castrés sur le développement de l'adénohypophyse, en comparant les effets observés à ceux obtenus avec un organe sexuel secondaire : les vésicules séminales. Différentes quantités d'hormones nous ont alors permis de déterminer un effet dose.

.../...

II - PARTIE EXPERIMENTALE

1 - Matériel et protocole expérimental

Les rats mâles, de souche wistar, proviennent de l'élevage JANVIER (53, LE GENEST). Ils nous sont fournis soit à la fin de sevrage (vers 20-22 jours), soit à leur naissance, avec la mère. Ils sont ensuite élevés au laboratoire par groupes de 5 animaux, avec nourriture et eau à volonté. L'éclairage a lieu de 7 heures à 19 heures. Les rats utilisés ont non seulement le même âge, mais sont les plus homogènes possibles en poids afin d'éviter les fluctuations individuelles.

L'hormone utilisée est du propionate de testostérone (Lightand Co) dissous dans de l'huile d'olive vierge neutralisée et stérilisée. Les dilutions sont effectuées en fonction des doses à injecter à chaque animal (cf. expériences).

Les injections sont réalisées par voie sous-cutanée (0,025 à 0,1 ml) par rat normal ou castré, pendant 30 jours, à raison de 6 injections par semaine.

Les castrations ont lieu sous anesthésie légère à l'éther.

Les expériences réalisées sont les suivantes :

Expérience I : effet du propionate de testostérone sur les rats normaux.

- Série 1 : 20 rats de 4 jours sont divisés en 2 groupes.
Le premier reçoit 25 , 50 puis 100 µg d'hormone, par période de 10 jours. Ces doses croissantes sont utilisées de manière à ne pas créer une trop grande disproportion entre le poids de l'animal et la quantité d'androgène.
Le second groupe reçoit en injections les volumes d'huile correspondants.

- Série 2 : 20 rats de 4 jours sont divisés en 2 groupes.
Le premier reçoit 0,5 , 1,0 puis 2,0 mg de propionate de testostérone par périodes de 10 jours. Le second groupe d'animaux reçoit les volumes d'huile correspondants.

.../...

- Série 3 : 15 rats de 23 jours sont divisés en deux groupes. Le premier (8 animaux) reçoit journellement 100 µg d'hormone pendant 30 jours. Le second reçoit le volume d'huile correspondant pendant le même temps.

Ces 3 séries d'expériences ont été mises en oeuvre dans le but de déceler un éventuel effet dose sur l'hypophyse des rats nouveau-nés (séries 1 et 2), tandis que la série 3 correspond à l'effet de l'hormone sur des hypophyses qui débutent leur phase de développement rapide (VALOTAIRE et DUVAL, 1969).

Expérience II : effet de la castration et de propionate de testostérone.

- Série 1 : 18 rats de 22 jours sont utilisés, dont 13 sont castrés et 5 opérés à blanc afin qu'ils subissent le même choc opératoire que les précédents (anesthésie, opération ...).

. Groupe 1 (7 animaux castrés) : injection journalière de 100 µg d'hormone pendant 30 jours.

. Groupe 2 (6 animaux castrés) : injection journalière du même volume d'huile.

. Groupe 3 (5 animaux opérés à blanc) : injection journalière du même volume d'huile.

- Série 2 : 30 rats de 25 jours sont utilisés, dont 25 sont castrés et 5 servent de témoins, non opérés.

. Groupe 1 (5 animaux) : injection journalière de 10 µg de propionate de testostérone pendant 30 jours.

. Groupe 2 (5 animaux) : injection de 25 µg d'hormone.

. Groupe 3 (5 animaux) : injection de 50 µg d'hormone.

. Groupe 4 (5 animaux) : injection de 100 µg d'hormone.

. Groupe 5 (5 animaux) : injection de 0,1 ml d'huile.

. Groupe 6 (5 animaux témoins) : injection de 0,1 ml d'huile.

.../...

- Série 3 : 17 rats de 21 jours sont castrés puis divisés en 3 groupes.

  . Groupe 1 (6 animaux) : injection de 100 µg d'hormone.
  . Groupe 2 (5 animaux) : injection de 150 µg d'hormone.
  . Groupe 3 (6 animaux) : injection de 0,1 ml d'huile.

2 - Traitement des organes

Les méthodes d'extraction et d'analyse relatives à l'hypophyse ont été mises au point par VALOTAIRE et DUVAL (1969 a, b). Elles dérivent de celles recommandées par MUNRO et FLECK (1966).

Après la dernière injection, les rats sont décapités sans anesthésie préalable, à l'aide d'une guillotine (HARVARD Apparatus Corp.). L'hypophyse est rapidement prélevée sans dommage ; la post. hypophyse est écartée. L'adénohypophyse est pesée puis déposée dans un homogénéiseur de Potter-Elvehgen contenant un volume approprié de H Cl O_4 0,3 N maintenu à 0°. On prélève de plus les testicules et les vésicules séminales. Après élimination du liquide séminal par séchage au papier filtre, ces divers organes sont pesés.

Les dosages de DNA, RNA et protéines ont été réalisés sur les hypophyses. Nous avons distingué arbitrairement deux types selon que le poids de ces organes est inférieur ou supérieur à 2 mg. Nous décrivons la technique relative aux glandes de plus de 2 mg et pour les petites, l'ensemble des volumes des diverses solutions est à diviser par deux.

Chaque hypophyse est broyée à l'aide d'un homogénéiseur Potter, dans 2 ml de H Cl O_4 0,3 N , à 0°. Le "Potter" est rincé 2 fois avec 0,5 ml de H Cl O_4 0,6 N. L'extrait (3 ml) est centrifugé pendant 15 minutes à 5 000 t/mn dans une centrifugeuse refroidie. Le surnageant qui contient les substances acido-solubles est prélevé. Le culot est lavé avec 0,5 ml de H Cl O_4 0,3 N

.../...

et l'ensemble est centrifugé. Cette opération est répétée une seconde fois. Les surnageants de lavage sont écartés. Le culot qui contient les substances acido-insolubles (acides nucléiques et protéines notamment) est remis en suspension dans 1 ml d'eau bidistillée. On ajoute alors 1 ml de KOH 0,6 N et on porte l'ensemble au bain-marie à 37° pendant 1 heure dans le but d'hydrolyser le RNA en fragments qui deviennent acido-solubles tandis que le DNA et les protéines passent en solution sans être dégradés.

Nous pouvons signaler que, contrairement à la technique classique de SCHMIDT et THANNHAUESER (1945), nous n'extrayons pas les lipides du culot acido-insoluble avant l'hydrolyse alcaline. La raison est qu'il y a peu de lipides dans l'adénohypophyse, et que ceux-ci ne sont pas gênants pour le dosage ultérieur de RNA et de DNA par spectrophotométrie UV.

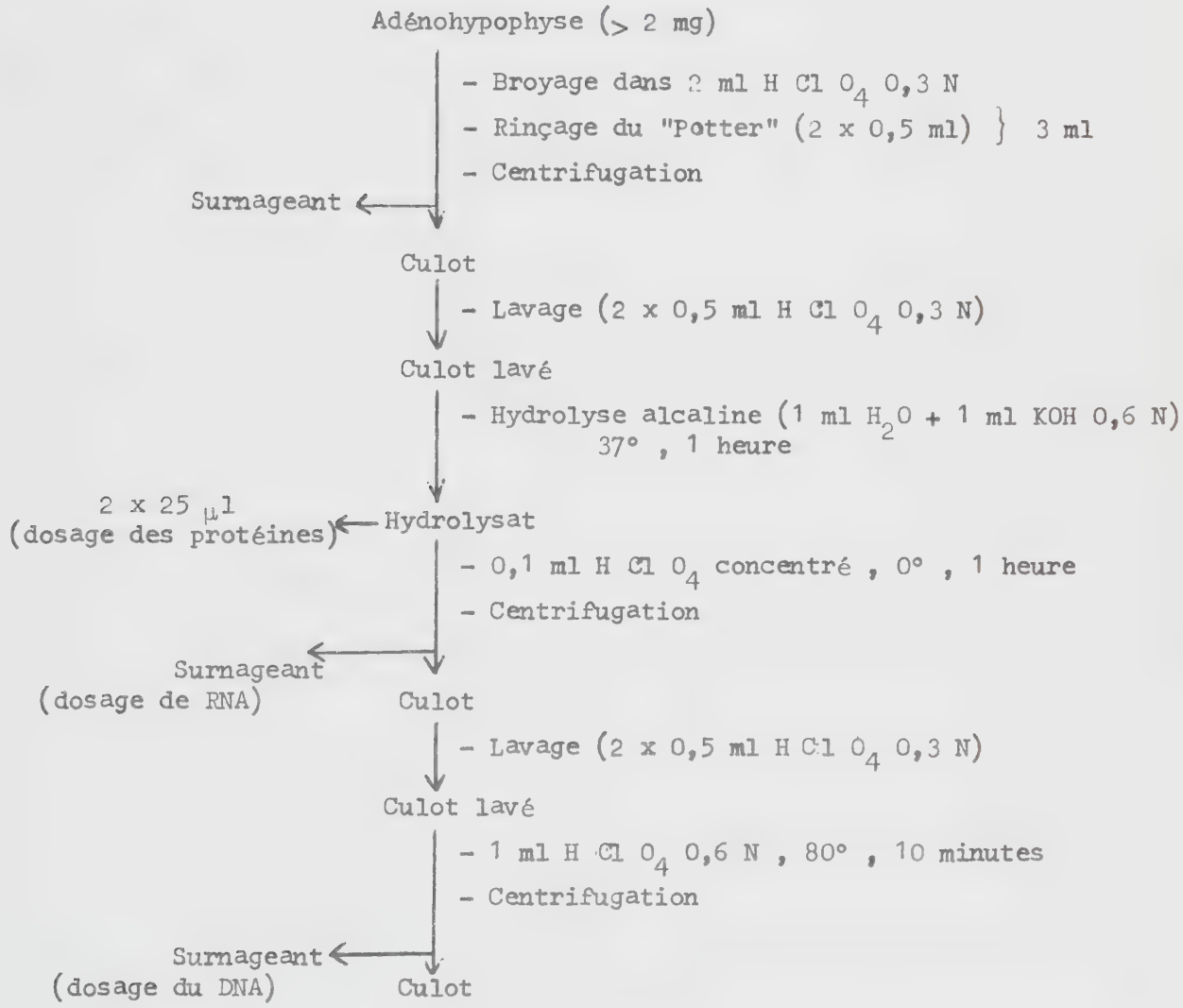
Après l'hydrolyse alcaline, on prélève 2 fois 0,025 ml pour le dosage des protéines (cf. 3. Dosages). A la solution résiduelle, on ajoute 0,1 ml de H cl O_4 11,6 N (concentration finale en H cl O_4 voisine de 0,3 N). On laisse précipiter pendant 1 heure à 0° ; on obtient donc un culot qui contient en plus de K cl O_4 , le DNA et l'ensemble des protéines. Le RNA hydrolysé est devenu acido-soluble. On centrifuge 15 minutes à 5 000 t/mn, à 4°. Le RNA est dosé directement sur le surnageant (cf. 3. Dosages).

Le culot qui contient le DNA et les protéines est lavé deux fois avec H cl O_4 0,3 N et recentrifugé. Les liquides de lavage sont éliminés. Le culot est remis en suspension dans 2 ml de H cl O_4 0,6 N. On bouche le tube avec une bille de verre pour éviter l'évaporation et on porte l'ensemble au bain-marie à 80° pendant 10 minutes exactement. On plonge ensuite rapidement le tube dans la glace. Cette opération a pour but d'extraire sélectivement le DNA qui, partiellement dégradé, devient acido-soluble. Signalons que cette étape est un point délicat dans la détermination de la quantité de DNA , car l'extraction n'est pas toujours parfaite. On centrifuge alors le tube à 5 000 t/mn, pendant 15 minutes à 4°, et on recueille le surnageant qui contient le DNA et le culot qui contient les protéines. Le DNA est dosé directement sur le surnageant (cf. 3. Dosages).

.../...

Remarque :

Certains auteurs préconisent l'emploi de l'acide trichloracétique (TCA) comme agent de précipitation au moment de l'homogénéisation du tissu. Ce TCA est ensuite éliminé lors de la délipidation par l'éther. Comme nous n'effectuons pas de délipidation, nous avons estimé plus commode d'utiliser $H\,Cl\,O_4$ durant toute la manipulation. L'ensemble des opérations est représenté sur le schéma suivant :



.../...

3 - Techniques de dosages

a - Protéines

Les protéines sont dosées par la technique de LOWRY et collaborateurs (1951).

1) Principe -

Le réactif de Folin (acide phosphotungstique et phosphomolybdique) est réduit par les groupes réducteurs des protéines tels que les groupements OH de la tyrosine au SH de la cystéine en un produit de couleur bleue absorbant à 720 mμ. LOWRY et collaborateurs (1951) ont rendu le dosage plus sensible en réalisant un pré-traitement cupro-alcalin qui peut rappeler la réaction du biuret.

Ce dosage ne peut servir pour doser en valeur absolue une protéine inconnue, car il est tributaire du nombre de groupements réducteurs. Il permet néanmoins des comparaisons entre échantillons analogues.

2) Réactifs -

- Réactif A : $Na_2 CO_3$ à 2 p.100 dans NaOH 0,1 N
- Réactif B : $Cu SO_4$ à 0,5 p.100 dans le tartrate de Na^+ et K^+ à 1 p.100
- Réactif C : 1 ml B + 49 ml A
- Réactif F : réactif de Folin (Merck) dilué au 1/2 avec de de l'eau bidistillée
- Solution étalon : albumine sérique de boeuf (fraction IV) à 100 mg/l
- Extrait biologique à doser dans KOH 0,3 N

.../...

3) Dosage -

La gamme étalon est réalisée avec 0 à 40 µg d'albumine (0 à 0,4 ml). On complète à 0,5 ml avec de l'eau bidistillée. On ajoute 1 ml de réactif C et on attend 10 minutes. On ajoute alors 0,1 ml de réactif F, en agitant. Après 30 minutes à l'obscurité, on lit la densité optique à 720 mµ.

Les dosages sont réalisés avec 0,025 ml (ou 0,050 ml) de l'extrait biologique hydrolysé par KOH 0,3 N.

b - RNA

Le RNA est dosé par détermination du maximum d'absorption à 260 mµ.

1) Principe -

Les nucléotides absorbent la lumière UV entre 200 et 300 mµ. Un mélange de nucléotides puriques et pyrimidiques absorbent la lumière de façon additive. De plus, l'extinction due à un polynucléotide est inférieure à celle de la quantité équivalente des nucléotides libres (phénomène d'hypochromicité). Un polynucléotide présente un maximum d'absorption au voisinage de 260 mµ. On détermine la valeur de ce maximum à l'aide d'un spectrophotomètre CARY 15. La concentration de RNA est reliée à la densité optique par la loi de Lambert Beer : $D.O. = \varepsilon \times l \times c$, avec :

D.O. = densité optique à 260 mµ

ε = coefficient d'extinction molaire

l = longueur du chemin optique (en général 1 cm)

c = concentration en moles/litre.

.../...

2) Etalonnage -

Nous avons utilisé comme étalon du RNA de levure de boulangerie qui nous a été gracieusement fourni par Monsieur le professeur EBEL. Comme il n'est pas possible de rapporter l'absorption d'une certaine quantité de RNA à son poids, car ce RNA est toujours plus ou moins hydraté et isolé en présence d'une certaine quantité de sel, nous avons utilisé la notation maintenant bien définie d' $\varepsilon(P)$, due à CHARGAFF et ZAMENHOF (1948), c'est-à-dire l'absorption d'une quantité de RNA correspond à la concentration de 1 atome-gramme de phosphore (P) par litre de solution. On peut alors écrire :

$$\varepsilon(P) = \frac{D.O.}{c \times 1}$$

avec c = concentration en atomes-grammes de P par litre.

La valeur de l' $\varepsilon(P)$ pour le RNA de levure est connue ; elle est environ égale à 7 500. Cette valeur permet d'estimer qu'une densité optique à 260 mμ égale à 1 est obtenue par une concentration de RNA égale à 0,043 mg/ml. Cette détermination est valable pour un RNA en solution neutre. Or, pour doser le RNA de l'hypophyse, nous réalisons une hydrolyse par KOH 0,3 N à 37° pendant 1 heure. Cette étape qui hydrolyse le RNA provoque une certaine hyperchromicité, d'où une densité optique supérieure pour la même concentration de RNA. VALOTAIRE, au laboratoire, a fait subir au RNA de levure le même traitement que celui subi par le RNA d'hypophyse. Il a trouvé qu'à une concentration de RNA de 1 μg/ml correspond une densité optique de 0,0305. Nous avons donc utilisé cette valeur comme référence.

3) Dosage -

Le RNA de l'hypophyse en solution dans H Cl O_4 0,3 N (après hydrolyse par KOH 0,3N) est dosé au spectrophotomètre. La densité optique est reliée à la quantité totale dans l'extrait par la relation :

$$\frac{D.O. \times 2,05 \times 2}{0,0305 \times 1,95} = D.O. \times 68,9$$

compte tenu des facteurs de dilution et du prélèvement du volume nécessaire au dosage des protéines.

Remarque :

Pour les hypophyses inférieures à 2 mg, la quantité totale de RNA est donnée par la relation :

$$\frac{D.O. \times 0,95 \times 1}{0,0305 \times 0,90} = D.O. \times 34,6$$

c - DNA

1) Principe -

Le principe est le même que pour le RNA.

2) Etalonnage -

Nous avons utilisé comme étalon du DNA de thymus de veau qui nous a été aimablement fourni par le docteur POUYET. De même que pour le RNA nous avons utilisé l' ε (P), qui est égal à 6 500 pour une solution de DNA à neutralité.

Après avoir fait subir à ce DNA le même traitement que celui subi par le DNA de l'hypophyse (hydrolyse alcaline, extraction par H Cl O_4 à 80°), VALOTAIRE (1964) a trouvé qu'une densité optique de 0,0295 correspond à 1 µg de DNA/ml.

.../...

3) Dosage -

De la même manière que pour le RNA, et compte tenu des différentes dilutions, la quantité totale de DNA par hypophyse est estimée à :

D.O. x 69,56 pour une hypophyse supérieure à 2 mg,

et à :

D.O. x 37,66 pour une hypophyse inférieure à 2 mg.

.../...

III - RESULTATS

1 - Effet du propionate de testostérone sur les rats normaux

Nous avons regroupé dans le tableau I les résultats relatifs aux séries 1 , 2 et 3 (expérience I). Les valeurs correspondent à la moyenne m de n mesures x $\pm$ l'erreur standard sur la moyenne :

$$m \pm s.e.m \text{ , avec } s.e.m = \sqrt{s_m^2} = \sqrt{\frac{1}{n(n-1)}\left[\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}\right]}$$

Les moyennes de chaque groupe (huile ou testostérone) sont composées à l'aide du test de Student, par estimation de la variance commune :

$$s^2 = \frac{\Sigma (x - m_A)^2 + \Sigma (x - m_B)^2}{n_A - 1 + n_B - 1}$$

et de la variable de Student t calculée à l'aide de la relation :

$$t = \frac{\left| m_A - m_B \right|}{\sqrt{\frac{s^2}{n_A} + \frac{s^2}{n_B}}}$$

a - Poids corporel -

On constate (tableau I) que les rats injectés avec l'hormone dès l'âge de 4 jours présentent une croissance plus rapide que les animaux injectés avec de l'huile, et ceci quelle que soit la dose d'androgène. On ne note par contre aucune différence significative avec les rats injectés de 23 à 53 jours.

.../...

TABLEAU I

INFLUENCE DE L'INJECTION DE DOSES VARIABLES DE PROPIONATE DE TESTOSTERONE SUR LE DEVELOPPEMENT DE CERTAINS ORGANES DU RAT IMPUBERE (EXPERIENCE I)

Organes		Série 1 m ± s . e . m (2)	Série 2 m ± s . e . m (3)	Série 3 m ± s . e . m
Poids corporel(g)	H (1)	81,2 ± 2,2 (*)	77,7 ± 0,8 (**)	208,9 ± 3,7
	TP	95,8 ± 3,4	85,9 ± 2,5	215,9 ± 4,3
Poids hypophyse(mg)	H	2,52 ± 0,12	2,43 ± 0,12	5,61 ± 0,23
	TP	2,39 ± 0,12	2,36 ± 0,11	5,23 ± 0,26
mg hypophyse / 100 g corps	H	3,08 ± 0,24 (*)	3,12 ± 0,16	2,68 ± 0,06 (*)
	TP	2,48 ± 0,08	2,74 ± 0,11	2,40 ± 0,09
Protéines/hyp.(µg)	H	294,0 ± 13,4	359,6 ± 23,6	862,9 ± 32,6
	TP	289,6 ± 16,8	348,6 ± 11,9	817,0 ± 28,6
µg protéines / mg Hypophyse	H	117,6 ± 1,67	139,0 ± 1,63 **	154,5 ± 4,6
	TP	121,1 ± 2,65	154,8 ± 1,70	157,3 ± 3,2
RNA/Hypophyse (µg)	H	13,8 ± 0,4	14,6 ± 1,1	37,0 ± 1,8
	TP	14,0 ± 0,9	16,5 ± 0,9	34,1 ± 1,8
µg RNA / mg Hypophyse	H	5,56 ± 0,15	5,64 ± 0,14 **	6,63 ± 0,13
	TP	5,88 ± 0,14	7,29 ± 0,16	6,52 ± 0,13
DNA/Hypophyse (µg)	H	16,0 ± 0,5	15,7 ± 0,8	31,1 ± 0,4
	TP	16,3 ± 1,3	15,2 ± 0,8	30,7 ± 1,3
µg DNA / mg Hypophyse	H	6,46 ± 0,20	6,09 ± 0,18 *	5,65 ± 0,17
	TP	6,77 ± 0,28	6,72 ± 0,15	5,89 ± 0,09
RNA/DNA	H	0,86 ± 0,01	0,93 ± 0,03	1,14 ± 0,01
	TP	0,88 ± 0,02	1,08 ± 0,01	1,10 ± 0,02
Protéines/DNA	H	18,31 ± 0,50	22,92 ± 0,63	27,37 ± 0,32
	TP	18,14 ± 0,51	23,10 ± 0,43	26,65 ± 0,42
Testicules (mg)	H	589,0 ± 29,2 (**)	572,8 ± 43,7 (**)	2 400 ± 7 (**)
	TP	109,5 ± 3,7	363,1 ± 24,8	480 ± 14
Vésicules séminales (mg)	H	13,3 ± 1,3 (**)	16,6 ± 1,9 (**)	116,2 ± 7,1 (**)
	TP	124,7 ± 7,6	214,4 ± 5,9	202,8 ± 7,3

Explications des renvois du tableau I

(1) - H : animaux injectés d'huile
TP: animaux injectés avec le propionate de testostérone

(2) - m ± s . e . m = moyenne ± erreur standard sur la moyenne ; série 1 : 9 animaux témoins seulement ont été utilisés.

(3) - Les pesées d'organes ont été réalisées sur 10 animaux témoins et 10 traités à la testostérone ; 6 animaux ont été utilisés seulement pour les dosages (protéines, RNA, DNA). Les hypophyses de chaque groupe ayant été réservées pour d'autres expériences.

(*) - Différence entre traités et non traités significative au seuil de 5 % par le test de Student.

(**)- Différence entre traités et non traités significative au seuil de 1 %.

Rappel

Série 1 = 20 rats de 4 jours sont divisés en 2 groupes. Le premier reçoit 25, 50 puis 100 µg d'hormone, par période de 10 jours. Le second groupe reçoit en injections les volumes d'huile correspondants.

Série 2 = 20 rats de 4 jours sont divisés en 2 groupes. Le premier reçoit 0,5 ; 1,0 puis 2,0 mg d'hormone par période de 10 jours. Le second groupe d'animaux reçoit les volumes d'huile correspondants.

Série 3 = 15 rats de 23 jours sont divisés en 2 groupes. Le premier (8 animaux) reçoit journellement 100 µg d'hormone pendant 30 jours. Le second reçoit les volumes d'huile correspondants.

b - Adénohypophyse

Le développement de l'adénohypophyse n'est pas affecté par le propionate de testostérone, quels que soient la dose d'hormone ou l'âge de début d'injection. On constate cependant que la glande des animaux injectés avec de l'hormone est systématiquement plus faible que celle des témoins. La différence n'est pas significative par le test de Student.

Etant donné cependant que pour les animaux traités avec l'androgène le poids corporel est constamment plus élevé et l'hypophyse plus petite que pour les rats traités à l'huile, le rapport pondéral hypophyse/corps devient plus élevé pour les seconds . La différence est statistiquement significative pour deux des trois séries.

En ce qui concerne les différents dosages (protéines, RNA et DNA), on ne constate aucune différence entre animaux témoins et traités, que l'on exprime les résultats en valeur absolue (par glande) ou en valeur relative (par mg de tissu).

c - Testicules

L'injection de testostérone à des rats impubères freine considérablement le développement des testicules, quels que soient la dose injectée ou l'âge du début d'injection.

L'inhibition du développement n'est pas fonction de la dose puisque les rats injectés avec 0,5 à 2,0 mg d'hormone possèdent des testicules plus gros que ceux qui ont reçu 25 à 100 µg de cette même hormone. Nous reviendrons sur ce phénomène dans la discussion .

.../...

d - Vésicules séminales

L'injection de propionate de testostérone provoque un développement très important de ces organes. Ce développement est fonction de la dose injectée. Il est d'autant plus marqué que les animaux ont été traités plus jeunes.

2 - Effet de la castration et de l'injection ultérieure d'hormone

a - Série 1

Les résultats obtenus avec les animaux de cette série figurent dans le tableau II.

L'effet de la castration se traduit par un sensible ralentissement du développement de l'animal, ainsi qu'en témoignent le poids corporel et le pourcentage d'augmentation au cours du traitement. L'injection de testostérone permet de lever partiellement cette inhibition. Il faut noter que pour cette expérience, les rats manquaient d'homogénéité, ceux du groupe ayant reçu l'hormone étant sensiblement plus petits au débit que les témoins.

La castration provoque le phénomène bien connu d'hypertrophie de l'adénohypophyse. Le calcul de l'intervalle de confiance à 95 % montre cependant que les réponses individuelles des animaux sont assez fluctuantes. La différence de poids d'organe entre castrés et témoins est néanmoins hautement significative. L'injection de 100 g d'hormone inhibe complètement l'hypertrophie de l'adénohypophyse. La glande des animaux traités est même inférieure en poids à celle des témoins. On constate cependant que le rapport hypophyse/corps est très voisin entre ces deux groupes d'animaux.

L'hypertrophie est également mise en évidence par l'augmentation de la quantité totale de protéines. Etant donné que le poids de l'adénohypophyse varie parallèlement à celui de ces macromolécules, le taux de protéines dans les 3 groupes reste sensiblement constant.

.../...

TABLEAU II - INFLUENCE DE LA CASTRATION ET DE L'INJECTION ULTERIEURE DE PROPIONATE DE TESTOSTERONE SUR LE DEVELOPPEMENT DE CERTAINS ORGANES DU RAT IMPUBERE (expérience II, série 1 ; injection journalière de 100 µg d'hormone).

Organes	Castrés + TP (groupe 1)	Castrés + huile (groupe 2)	Opérés + huile (groupe 3)
Poids à 22 jours (g)	44,3	53,0	50,2
Poids à 52 jours (g)	187 ± 21	188 ± 14	228 ± 19
Augmentation de poids pendant l'injection (%)	324	255	354
Adénohypophyse (mg)	4,55 ± 0,68	7,18 ± 1,03 (1/2 $P < 0,001$)	5,76 ± 0,28 (2/3 $P < 0,05$)
mg hypophyse / 100 g corps	2,44 ± 0,31	3,81 ± 0,29 (1/2 $P < 0,001$)	2,53 ± 0,21 (2/3 $P < 0,001$)
Protéines/hypophyses (µg)	641 ± 158	1 096 ± 163 (1/2 $P < 0,001$)	845 ± 41 (2/3 $P < 0,01$)
µg Protéines/mg hypophyses	142,0 ± 36,2	152,4 ± 6,6 (1/2 n.s.)	146,6 ± 4,31 (1/2 n.s.)
RNA/hypophyses (µg)	29,04 ± 3,38	44,72 ± 9,45 (1/2 $P < 0,001$)	38,01 ± 4,35 (2/3 n.s.)
µg RNA/mg hypophyses	6,42 ± 0,40	6,18 ± 0,44 (1/2 n.s.)	6,79 ± 0,19 (2/3 $P < 0,05$)
DNA/hypophyses (µg)	22,40 ± 1,90	31,08 ± 4,57 (1/2 $P < 0,001$)	27,30 ± 3,91 (2/3 n.s.)
µg DNA/mg hypophyses	4,99 ± 0,55	4,32 ± 0,24 (1/2 $P < 0,05$)	4,74 ± 0,66 (2/3 n.s.)
Vésicules séminales (mg)	155,7 ± 20,8	9,0 ± 3,8 (1/2 $P < 0,001$)	118,0 ± 33,8 (2/3 $P < 0,001$)

Les résultats sont exprimés selon $m \pm t_{0,05} S_m$. Les comparaisons entre groupes sont effectuées à l'aide du test de Student ; n.s. = différence non significative au seuil de 5 %.

En ce qui concerne les quantités totales de RNA et de DNA, nous constatons une augmentation globale consécutive à la castration, mais étant donné la dispersion des résultats, notamment pour les animaux castrés, la différence n'est pas statistiquement significative, le nombre de rats utilisés étant trop faible. Le propionate de testostérone inhibe complètement cet accroissement de DNA et de RNA, et les concentrations de ces acides nucléiques restent sensiblement constantes dans les 3 groupes.

Si la castration provoque l'hypertrophie de l'adénohypophyse, elle entraîne par contre une atrophie dramatique des vésicules séminales. Cette atrophie est abolie par l'injection d'hormone, la dose utilisée provoquant même une hypertrophie de ces grandes si on compare au groupe des rats normaux.

b - Série 2

Nous constatons (tableau III, groupes 5 et 6) que la castration produit le même phénomène sur les animaux de cette série que pour les précédents. Il y a augmentation du poids hypophysaire et des quantités totales de protéines, RNA et DNA. Il y a également atrophie complète des vésicules séminales.

Les résultats concernant l'action de l'hormone sont par contre très fluctuants. En fonction de doses croissantes, on voit bien diminuer le poids de l'adénohypophyse, ou plus exactement le rapport mg hypophyse/100 g poids corporel, mais l'injection de 100 μg d'hormone ne ramène pas les valeurs au niveau de celles des animaux témoins. Les dosages réalisés avec les animaux de cette série, et particulièrement ceux de DNA sont mauvais ; l'extraction de DNA a probablement été incomplète, car les concentrations normales sont comprises entre 4 et 5 (cf. tableau II) et non entre 2,8 et 3,8 (tableau III).

.../...

TABLEAU III - INFLUENCE DE LA CASTRATION ET DE L'INJECTION ULTERIEURE DE DOSES CROISSANTES DE PROPIONATE DE TESTOSTERONE SUR LE DEVELOPPEMENT DE L'ADENOHYPOPHYSE ET DES VASICULES SEMINALES DU RATS IMPUBERE (Expérience II, série 2)

	Castrés+ 10 µg TP (groupe 1)	Castrés+ 25 µg TP (groupe 2)	Castrés+ 50 µg TP (groupe 3)	Castrés+ 100 µg TP (groupe 4)	Castrés+H (groupe 5)	Opérés+H (groupe 6)
Poids à 25 j (g)	60,6	53,2	55,0	65,5	53,6	61,8
Poids à 55 j (g)	206	190	181	232	195	225
Adénohypophyse (mg)	8,05	7,27	6,50	7,42	7,96	5,88
$\frac{\text{mg hypophyse}}{100\text{ g corps}}$	4,10	3,83	3,59	3,20	4,08	2,62
Protéines/hyp. (µg)	1 155	1 197	1 074	1 144	1 293	853
µg Prot/mg Hyp.	143,2	164,7	164,6	152,2	163,7	144,6
RNA/hypophyses (µg)	44,93	49,44	40,73	50,82	48,36	42,42
µg RNA/mg Hypophyses	5,58	6,79	6,26	6,85	6,08	7,20
DNA/hypophyses (µg)	22,69	27,13	24,34	22,67	29,01	22,20
µg DNA/mg Hypophyses	2,82	3,74	3,71	3,06	3,64	3,77
Vésicules séminales	18,89	28,76	71,94	98,85	9,51	125,02

Etant donné les résultats assez décevants obtenus lors de cette étude, nous avons entrepris une nouvelle expérience (3ème série), avec seulement 2 doses d'hormone : 100 et 150 µg, en prenant bien soin d'utiliser des animaux les plus homogènes possibles en poids, ce qui n'était pas tout à fait le cas pour la 2ème série (comparer par exemple les poids initiaux des groupes 2 et 4, tableau III).

c - Série 3

Etant donné que nous avons utilisé des animaux d'un poids correspondant aux témoins de la série 1 (groupe 3, tableau II), nous pouvons valablement comparer les rats de ces deux séries d'expériences. La castration produit non seulement une hypertrophie de l'adénohypophyse (augmentation des quantités totales de RNA et de protéines), mais également une hyperplasie (augmentation de la quantité totale de DNA). Les vésicules séminales sont extrêmement atrophiées.

L'injection des 100 µg de propionate de testostérone empêche complètement ces phénomènes, puisque les différents paramètres estimés correspondent à ceux des témoins. L'injection de 150 µg d'hormone ne produit pas d'effet plus important. On peut noter que les résultats obtenus avec cette série 3 sont particulièrement précis, ceci étant dû à l'homogénéité des animaux utilisés.

.../...

TABLEAU IV - INFLUENCE DE LA CASTRATION ET DE L'INJECTION ULTERIEURE DE PROPIONATE DE TESTOSTERONE SUR LE DEVELOPPEMENT DE L'ADENOHYPOPHYSE ET DES VESICULES SEMINALES DU RAT IMPUBERE (Expérience III, série 3)

Organes	Castrés + 100 µgTP (groupe 1)	Castrés + 150µg TP (groupe 2)	Castrés + huile (groupe 3)
Poids à 21 jours (g)	47,1	50,2	49,9
Poids à 51 jours (g)	200,0 ± 8,2	206,1 ± 15,8	184,2 ± 6,7
Augmentation de poids en 30 j (%)	325	310	270
Adénohypophyse (mg)	5,78 ± 0,77	5,79 ± 0,38	7,54 ± 0,35
$\frac{\text{mg Hypophyse}}{100\text{ g corps}}$	2,89	2,81	4,09
Protéines/hypophyses (µg)	860,0 ± 140,8	873,6 ± 124,4	1141,3 ± 82,7
µg Protéines/mg hypophyses	148,2 ± 7,4	150,7 ± 14,9	151,2 ± 8,2
RNA/Hypophyses (µg)	36,68 ± 5,21	38,68 ± 3,27	45,25 ± 2,11
µg RNA/mg Hypophyses	6,35 ± 0,31	6,68 ± 0,36	6,00 ± 0,31
DNA/Hypophyses (µg)	27,40 ± 3,23	26,61 ± 2,63	33,35 ± 2,64
µg DNA/mg Hypophyses	4,75 ± 0,36	4,95 ± 0,64	4,41 ± 0,17
Vésicules séminales (mg)	147,9 ± 30,6	184,4 ± 7,5	5,6 ± 1,8

Les résultats sont exprimés selon $m \pm t_{0,05}\, S_m$.

IV - DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

1 - Effet de l'hormone sur les rats normaux

Lorsque l'on se réfère aux différentes études déjà publiées relatives à l'action de la testostérone sur le rat mâle, il faut distinguer deux processus expérimentaux très différents.

Le premier correspond à l'"androgénisation" de l'hypothalamus, phénomène produit par une injection unique et massive d'hormone à la naissance ou dans les premiers jours de la vie post-natale. Deux études de SWANSON et VAN DER WERFF TEN BOSCH (1964, 1965) montrent que l'injection d'une dose unique de testostérone (5 à 500 µg) produit un certain nombre d'effets permanents sur le développement des organes sexuels du rat mâle. Ces effets ne se font sentir qu'à partir d'une certaine dose d'hormone (50 µg au minimum). En injectant 500 µg d'androgène aux 3 ou 4ème jours après la naissance, ces auteurs constatent que les testicules sont immédiatement réduits par rapport à ceux des témoins ; par contre, les vésicules séminales et la prostate ventrale sont stimulées par l'hormone dans les quelques jours qui suivent l'injection ; elles deviennent ensuite plus petites que celles des animaux témoins, car les testicules demeurent plus petits. Dans une étude plus récente, KURCZ et collaborateurs (1969), obtiennent des résultats analogues ; ils indiquent : "l'administration d'androgène à des rats nouveau-nés diminue le poids à la fois des testicules et des organes génitaux accessoires. La testostérone est plus efficace si elle est administrée le premier jour de la vie que si elle est administrée le troisième jour". Des résultats semblables ont été obtenus par JOHNSON et WITSCHI (1963) et JOHNSON et collaborateurs (1964).

Le second processus expérimental que nous devons considérer est celui de l'administration prolongée d'hormone à des rats impubères, à raison de doses journalières. C'est à ce sedond processus que correspondent nos propres expériences. Nous indiquons que l'injection journalière de testostérone à des doses variables (0,025 à 0,100 mg et 0,5 à 2,0 mg) à des rats de 4 jours ou de 23 jours provoque une diminution des testicules et une augmentation du poids des vésicules séminales.

.../...

En ce qui concerne les vésicules séminales, les résultats sont absolument conformes à ceux déjà indiqués par un grand nombre d'auteurs (GUI POUMEAU DE LILLE, 1953). Il est en effet évident que la croissance de ces organes est stimulée normalement par la testostérone issue du testicule. Si on injecte journellement une dose au moins équivalente à la dose physiologique (voir plus loin pour la détermination de cette dose), les vésicules séminales des animaux traités deviennent plus lourdes à celles des animaux témoins.

En ce qui concerne les testicules, l'inhibition de la croissance par l'hormone est également normale ; la testostérone injectée exerce un feed bock négatif au niveau du système hypothalamo-hypophysaire et inhibe la secrétion des gonadostimulines. Les testicules qui ne sont plus stimulés croissent d'une manière ralentie. On peut cependant être supris par le fait que l'injection de fortes doses d'hormone (0,5 à 2,0 mg/jour) inhibe moins leur croissance que les faibles doses (0,025 à 0,100 mg/jour). Lorsque l'on effectue des recherches dans la littérature, on s'aperçoit que ce phénomène a été considérablement étudié et qu'il a conduit à des résultats fort contradictoires. L'ensemble des résultats a été particulièrement analysé par POUMEAU DE LILLE (1953) qui conclut qu'une faible dose de testostérone inhibe plus la croissance des testicules qu'une forte dose. En effet, pour une injection de 1,0 mg/jour, "l'androgène atteint une concentration suffisante qui lui permet d'agir directement sur le testicule, en assurant sa croissance et le développement de la lignée spermatique". Nos résultats confirment donc ces conclusions.

Si nous étudions ensuite le développement de l'adénohypophyse, nous constatons que l'injection de faibles ou fortes doses d'hormone n'inhibe pas, d'une manière significative, la croissance de cette dernière. Bien que pour les 3 séries d'animaux (tableau I), la glande des animaux traités soit toujours plus petite que celle des témoins, il faudrait probablement utiliser un très grand nombre de rats pour observer, peut-être une différence significative. Nos résultats peuvent sembler en contradiction avec ceux de ARAI et MASUDA (1960) qui ont injecté 0,5 à 2,0 mg d'hormone pendant 30 jours à des rats nouveau-nés (conditions expérimentales voisines de celles que nous avons utilisées pour la série 2 - tableau I-). Cependant, ces auteurs

.../...

attendent ensuite 120 jours après la fin des injections avant de sacrifier les animaux. La différence entre nos résultats vient peut-être de cette période supplémentaire au cours de laquelle un certain nombre de phénomènes peuvent se produire. Si l'on esprime nos résultats sous forme de rapport poids d'organe/poids corporel, nous observons également une certaine diminution, mais due aussi bien à l'augmentation de poids corporel qu'à la diminution de l'hypophyse.

L'analyse des quantités de protéines, RNA et DNA montre de plus que le développement de l'adénohypophyse n'est absolument pas inhibé par la testostérone.

En conclusion de cette étude, nous pouvons dire que si l'action de la testostérone se fait sentir au niveau des organes sexuels de rat mâle, cette même hormone n'inhibe pas le développement de l'adénohypophyse au cours de la croissance, donc pendant la maturation sexuelle. Nos résultats confirment donc ceux de SCHREIBER et KMENTOVA (1964) qui montrent que l'injection de 2,5 mg de testostérone, 2 fois par semaine, à des rats adultes, ne produit aucun effet sur le développement de l'adénohypophyse.

2 - Effet de la castration et de l'injection ultérieure d'hormone

Si nous considérons tout d'abord les vésicules séminales, nous remarquons que la castration provoque une atrophie considérable de cet organe, par élimination de la source de testostérone nécessaire à sa croissance. Ce résultat classique n'entraîne pas de discussion, il nous servait surtout de test pour comparer hypophyse et organes sexuels secondaires.

Il est par contre intéressant de déterminer la dose journalière minimum d'hormone nécessaire à la croissance normale des vésicules séminales. Pour cela, nous avons réuni dans une série de figures (1, 2 et 3) les résultats des 3 séries d'animaux castrés et injectés,

.../...

en calculant les moyennes et les écarts-types ($\pm \sqrt{s^2}$) pour chaque groupe d'animaux. Ce calcul était possible car les rats des 3 séries étaient relativement voisins du point de vue âge et poids au début de l'expérience, et ils ont tous été traités pendant 30 jours.

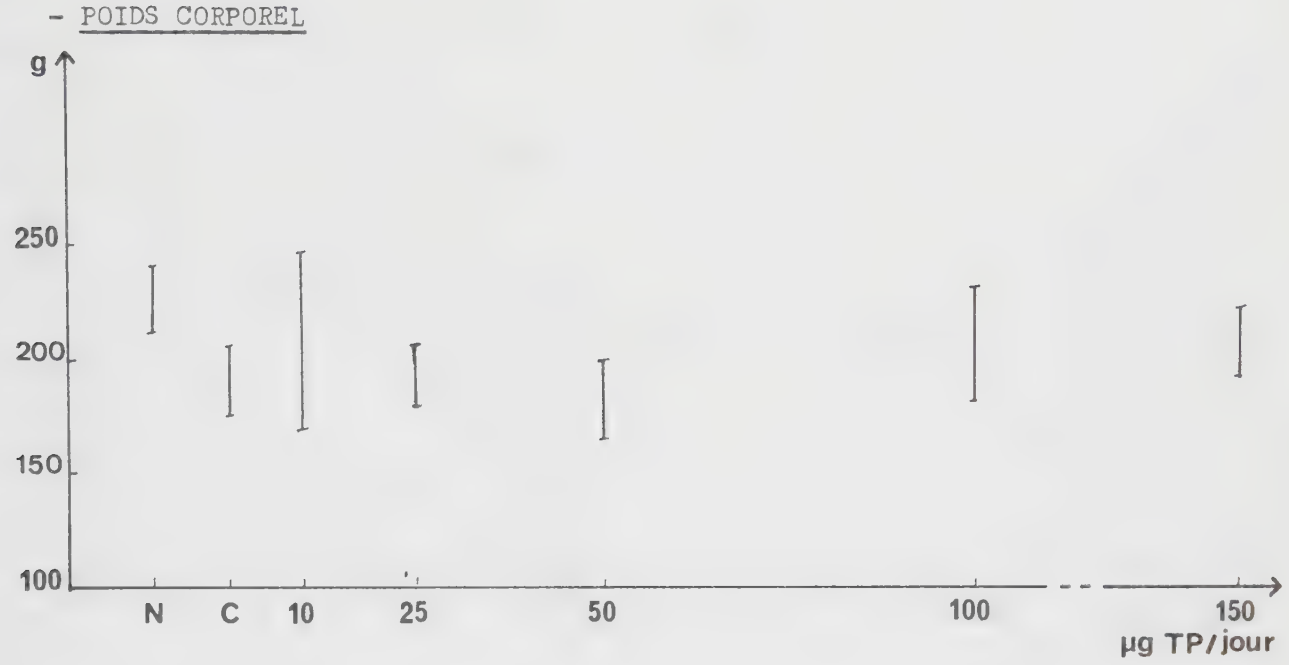
La figure 1 nous montre qu'il faut une injection journalière d'environ 0,080 à 0,100 mg de propionate de testostérone pour ramener les vésicules séminales des animaux castrés au poids de celles des rats témoins. Ces résultats correspondent très exactement à ceux de FADIAL et collaborateurs (1967) qui indiquent que la quantité de testostérone nécessaire pour le rat est de 0,023 à 0,0045 mg/jour pour 100 g de poids corporel.

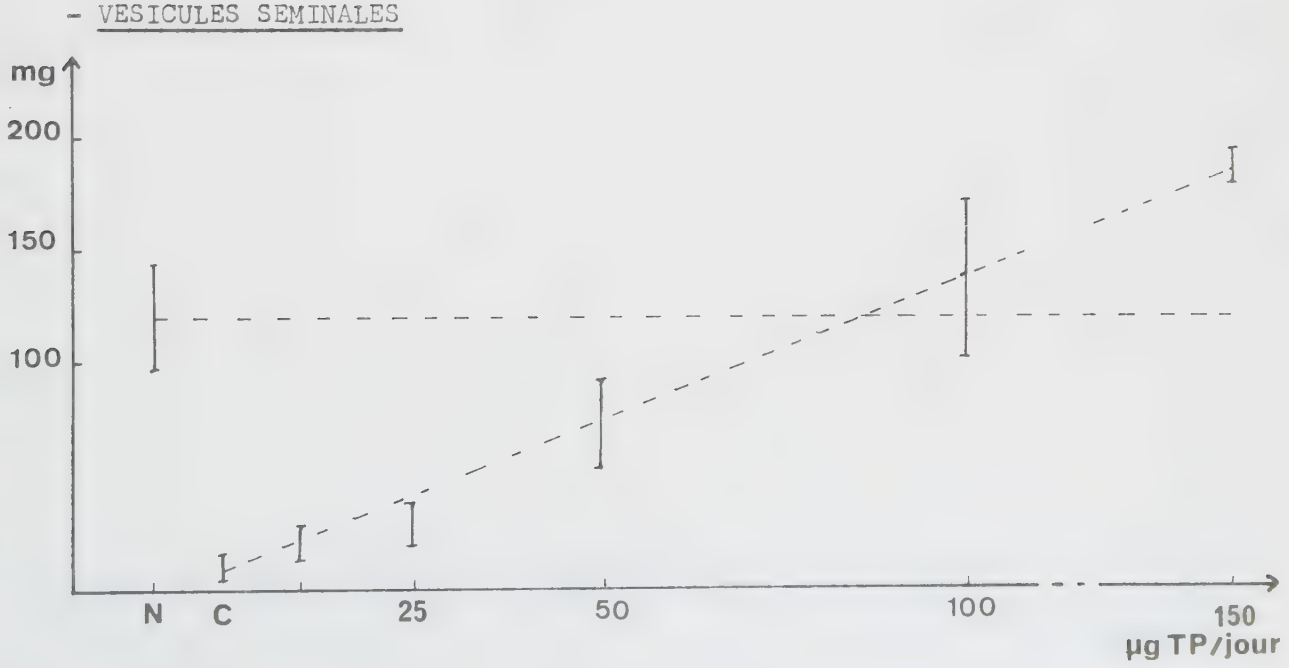
Si nous considérons maintenant l'adénohypophyse, la castration provoque une hypertrophie, mais également une hyperphasie sensible, c'est-à-dire une division cellulaire accrue si l'on admet la quantité de DNA par cellule constante, Ces résultats coïncident avec ceux de KRAICER et CHENG (1968) et ceux publiés plus récemment par VALOTAIRE et DUVAL (1970). L'injection de propionate de testostérone annule l'effet de la castration, en ce sens que pour une certaine dose journalière, l'hypophyse des animaux traités est de même poids que celle des témoins. En regroupant les 3 séries de l'expérience II sur la figure 2, on se rend compte que la dose nécessaire pour empêcher l'hypertrophie des glandes est comprise entre 0,080 et 0,100 mg de propionate de testostérone par jour, soit la même dose que celle agissant sur les vésicules séminales. Les dosages des protéines et de RNA confirment totalement ces résultats. Les dosages de DNA ne sont pas aussi probants ; nous constatons cependant que la castration provoque toujours une augmentation globale de la quantité de DNA et que l'injection de testostérone inhibe l'hyperplasie. Etant donné la dispersion des résultats et la mauvaise extraction lors des expériences de la série 2 (10, 25 , 50 µg d'hormone), il n'est pas possible d'indiquer valablement un effet dose. On peut néanmoins penser que la dose d'androgène nécessaire pour inhiber l'hyperplasie due à la castration est voisine, sinon la même, que celle nécessaire pour inhiber l'hypertrophie.

.../...

En conclusion, la testostérone injectée à des rats castrés agit sur le développement anormal de l'adénohypophyse, mais elle n'a pas d'action sensible sur le développement normal de cet organe, quelle que soit la dose utilisée. Alors que cette action freinatrice de la testostérone se manifeste en l'absence d'hormone testiculaire chez le rat castré, il est probable qu'il existe chez le rat normal un phénomène de compensation qui maintient un développement quasi-normal de l'adénohypophyse tout en permettant à la testostérone d'exercer une régulation de la production des "releasing factors" hypotholamiques, donc de la production des gonadotrophines.

FIGURE 1 - INFLUENCE DE LA CASTRATION ET DE L'INJECTION ULTERIEURE DE DOSES CROISSANTES DE PROPIONATE DE TESTOSTERONE SUR LE POIDS CORPOREL DES RATS ET SUR LES VESICULES SEMINALES -

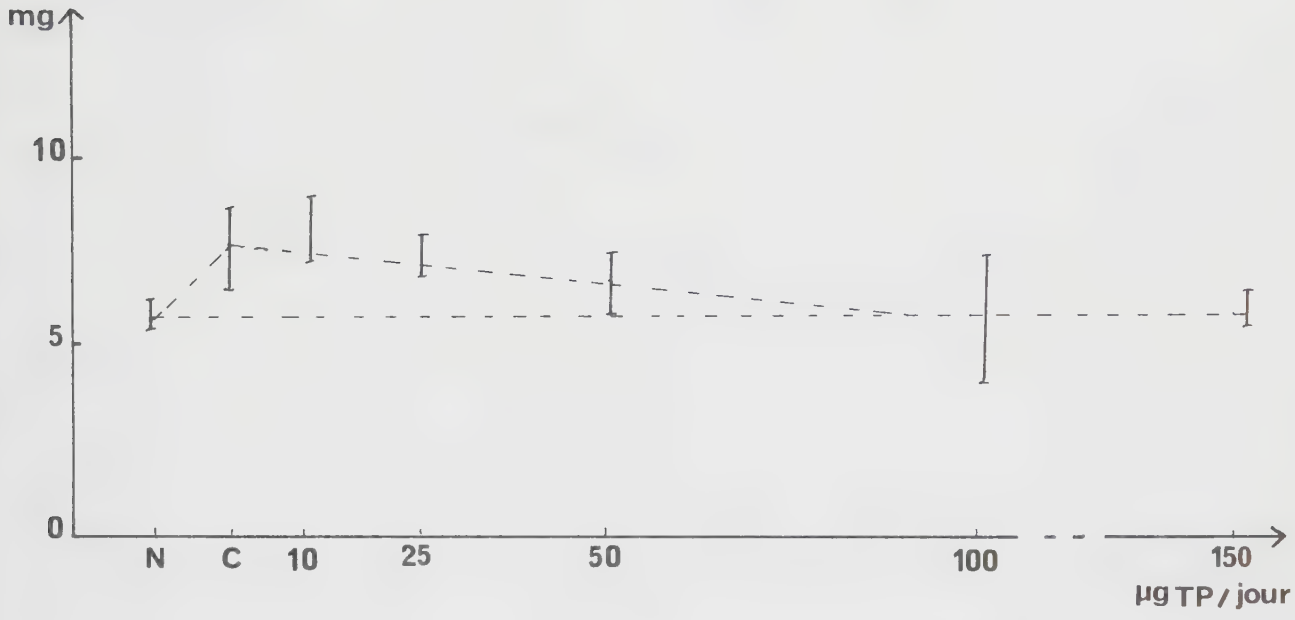




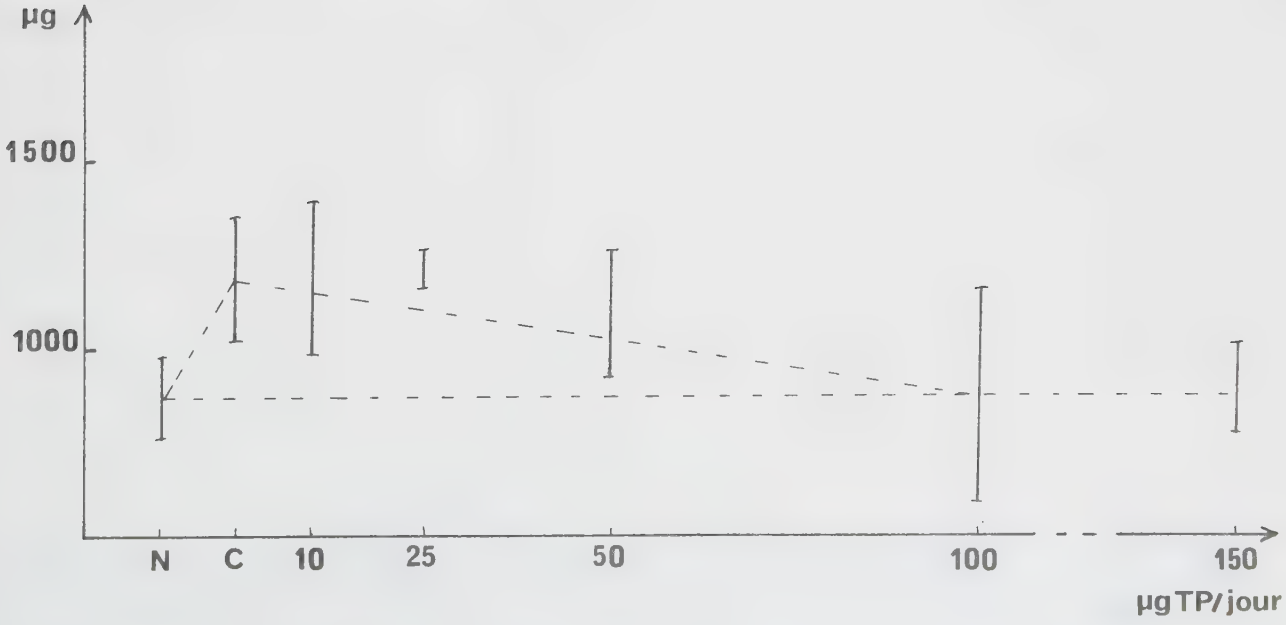
Les barres représentent l'intervalle m $\pm$ écart-type ($m \pm \sqrt{s^2}$)

FIGURE 2 - INFLUENCE DE LA CASTRATION ET DE L'INJECTION ULTERIEURE DE DOSES CROISSANTES DE TP SUR LE POIDS D'HYPOPHYSE DES RATS ET SUR LE RAPPORT PROTEINE PAR HYPOPHYSE -

- POIDS HYPOPHYSE -

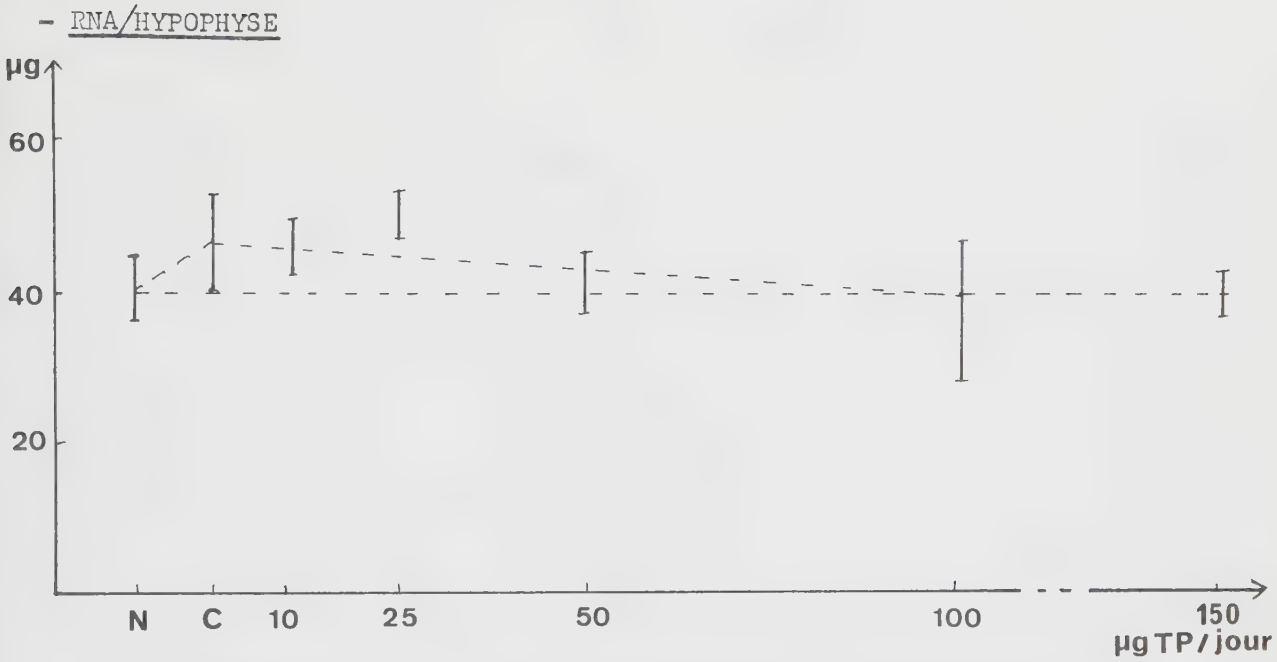


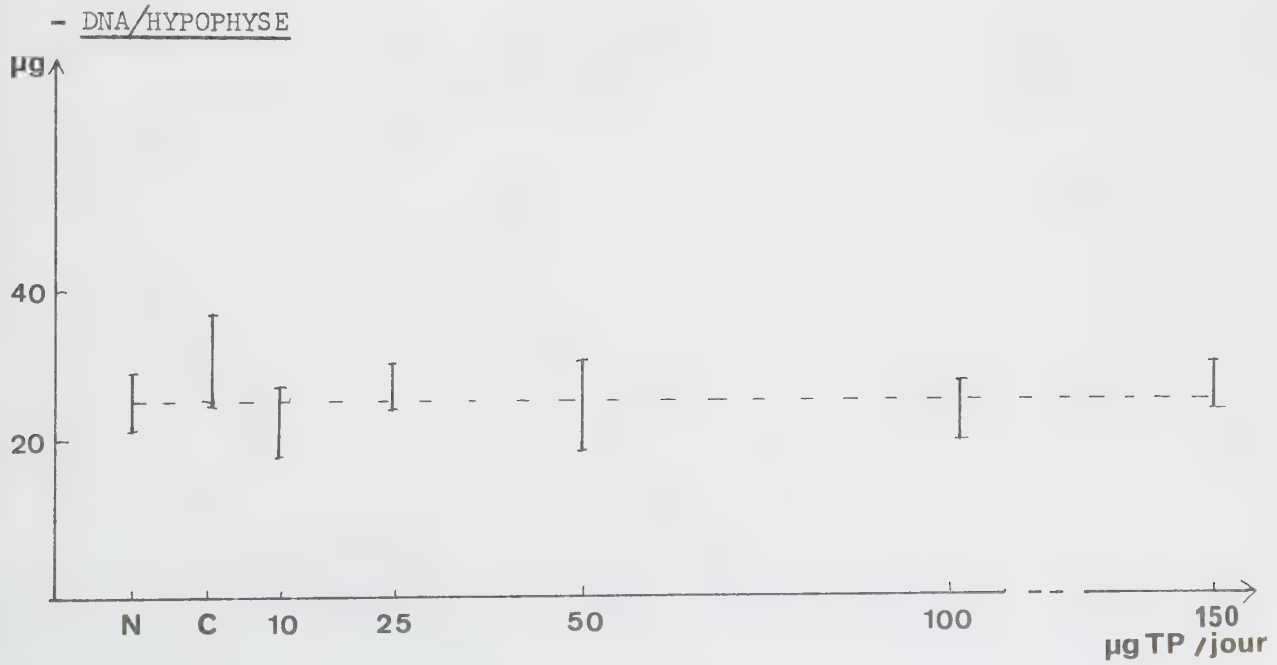
- PROTEINES/HYPOPHYSE



Les barres représentent l'intervalle $m \pm$ écart-type $(m \pm \sqrt{s^2})$

FIGURE 3 - INFLUENCE DE LA CASTRATION ET DE L'INJECTION ULTERIEURE DE DOSES CROISSANTES DE TP SUR LES RAPPORTS RNA/ORGANE ET DNA/ORGANE -





Les barres représentent l'intervalle m $\pm$ écart-type ($m \pm \sqrt{s^2}$)

DEUXIEME PARTIE

DETERMINATION DE L'ESPACE EXTRACELLULAIRE DES HYPOPHYSES DES RATS NORMAUX ET CASTRES

I - INTRODUCTION

Un tissu donné est constitué de cellules et caractérisé par le volume extracellulaire et le volume intracellulaire.

Diverses méthodes ont été mises au point pour étudier la pénétration de différentes substances dans le tissu. Pour le tissu animal, on emploie surtout les isotopes radioactifs =

^{24}Na ^{36}cl ^{42}K ^{45}Ca ....

des molécules organiques marquées au :

^{3}H ^{14}C ^{32}P .....

Quand on étudie la pénétration d'un précurseur :

- ou bien, on estime simplement le rapport :

$$\frac{\text{c p m / g tissu}}{\text{c p m / ml de milieu}}$$

et dans ce cas, il n'y a pas de distinction possible entre les c p m extracellulaire et les c p m intracellulaire (GIESE, 1968)

- ou bien, le rapport :

$$\frac{\text{c p m / ml de volume intracellulaire}}{\text{c p m / ml de milieu}}$$

qui donne une idée de la concentration du précurseur dans les cellules du tissu, d'où une distinction possible entre le transport actif d'une substance et la diffusion passive (BERGALOFF, 1969)

La détermination du volume intracellulaire nécessite :

a) la connaissance du volume d'eau totale,

b) la connaissance du volume extracellulaire.

.../...

Le premier est facilement accessible par dessication de l'organe jusqu'au poids sec, soit directement après prélèvement, soit après incubation.

Le second doit être déterminé à l'aide d'une substance qui ne traverse pas la membrane cellulaire : l'inuline, polymère du fructose, de poids moléculaire voisin de 5 000 est souvent utilisée.

De nombreux auteurs ont entrepris la détermination de l'espace extracellulaire des tissus de différents organes d'animaux d'espèces diverses.

- BOURKE et TOWER (1966) qui travaillent sur des coupes de cortex cérébral du chat adulte trouvent la valeur de 42,6 $\pm$ 3,1 % (pourcentage de l'espace extracellulaire exprimé par rapport au poids initial de tissu humide) après 65 minutes d'incubation en aérobie à 37°.

- LEVI et LATTES (1970) qui étudient la variation de l'espace extracellulaire des tissus de cerveau de poulet en fonction de l'âge (études sur des coupes) ont donné la valeur de 37 % comme espace extracellulaire par rapport au poids du tissu humide après incubation chez le poussin de 15 jours (préincubation 20 minutes ; incubation 40 minutes, à 37° en atmosphère oxygénée).

- D'autres auteurs, VERNADAKIS et WOODBURY (1965), WOODWARD et collaborateurs (1964), REED et WOODBURY (1964) ont réalisé des expériences in vivo sur des poulets adultes et ont fourni des valeurs plus petites : de 12 à 17 %.

.../...

Chez le rat, les études sont faites sur différents organes :

- COHEN et collaborateurs (1968) ont travaillé sur des coupes de cerveau et ont trouvé un espace extracellulaire de 50,4 % après 120 minutes d'incubation à 37°.

- ROSENBERG et collaborateurs (1961) ont entrepris des expériences sur des coupes de cortex rénal et ont donné deux valeurs par rapport au poids du tissu humide final :

27,9 ± 0,7 % après 30 minutes d'incubation ,

38,5 ± 1,3 % après 120 minutes d'incubation.

Lorsque l'on étudie l'incorporation d'un précurseur (nucléoside, acide aminé) dans un type de molécule (acide nucléique, protéine) chez des animaux qui ont subi un certain nombre de traitements, il semble important de s'assurer au préalable que le volume intracellulaire de l'organe étudié n'est pas modifié par les traitements en cours. Dans le cas contraire, il faut alors tenir compte de la variation de concentration du précurseur dans la cellule ; si l'on peut déterminer la valeur du pool endogène de précurseur, on peut aussi estimer la modification d'activité spécifique de la molécule radioactive. Par la suite seulement, on peut interpréter une variation du taux d'incorporation dans la molécule étudiée. Il est curieux de constater que la plupart des auteurs qui travaillent avec des précurseurs marqués négligent complètement cette étude préliminaire.

Etant donné que le but de notre étude suivante est de déterminer la pénétration, les transformations métaboliques et l'incorporation de l'acide orotique -$\left[^{14}C\right]$ dans le RNA de l'adénohypophyse de rats impubères ou adultes et normaux ou castrés, nous nous sommes attachés à déterminer le volume d'eau totale et le volume intracellulaire de cette glande pour les différents animaux utilisés.

.../...

II - MATERIEL ET METHODES

1 - Traitement des animaux

- Elevage et castration

L'élevage et les castrations sont réalisés selon les modalités décrites dans le chapitre précédent.

- Inuline utilisée

L'inuline utilisée est soit de l'inuline $\left[^{3}H\right]$ en provenance du C.E.A. (activité spécifique = 0,2 mC/mg) soit de l'inuline carboxy $-^{14}C$ en provenance de Amersham (activité spécifique = 2,5 mC/g).

- Séries d'expériences

Nos expériences ont été faites sur des rats castrés depuis 7 jours et sur des rats adultes castrés depuis 14 jours, délais après lesquels la différence de poids entre les hypophyses des rats castrés et celles des normaux commence à être significative (VALOTAIRE et DUVAL, 1968).

Pour la détermination du volume d'eau total, nous avons réalisé 4 séries d'expériences :

a) 7 rats normaux de 65 jours
   8 rats " " "

b) 10 rats normaux de 27 jours
   10 rats castrés de (20 jours + 7 jours de castration)

c_1) 6 rats normaux de 93 jours
   6 rats castrés de (78 + 15 jours de castration)

d_1) 10 rats normaux de 29 jours
   6 rats normaux de 97 jours.

.../...

Pour la détermination du volume extracellulaire, 4 séries d'expériences ont été faites :

a_2) 5 rats normaux de 93 jours

b_2) 7 rats castrés de 29 jours (8 jours de castration)
8 rats normaux de 29 jours

c_2) 8 rats normaux de 30 jours
8 rats castrés de 30 jours (7 jours de castration)

d_2) 7 rats normaux de 90 jours
7 rats castrés de 90 jours (15 jours de castration)

2 - Prélèvement des hypophyses et incubation

Les rats sont décapités sans anesthésie et les hypophyses rapidement prélevées.

a) Incubation sans inuline, pour la détermination du volume d'eau total

Les post-hypophyses éliminées, on place les adénohypophyses dans une fiole contenant du liquide de Krebs (qui se compose de 119 mM Nacl , 4,5 mM Kcl , 1,9 mM $Cacl_2$, 3,1 mM Mg cl_2 , 25 mM NaH CO_3 , 0,45 mM Na_2 H P O_4 , 11,1 mM glucose) préoxygéné et à une température de 37°, à raison de 2 ml par hypophyse.

On laisse incuber en atmosphère d'oxygène et en agitation constante pendant 1 heure 15.

.../...

b) Incubations avec inuline

Les post-hypophyses éliminées, on place les adénohypophyses chacune dans une fiole contenant 2 ml de Krebs préoxygéné et à une température de 37°.

Au bout de 10 minutes de préincubation, le liquide d'incubation est enlevé. On le remplace par 2 ml de milieu frais, préoxygéné et on ajoute alors pour les séries a_2 , b_2 , 2 µC d'inuline ^3H , et pour les séries c_2 , d_2 2 µC d'inuline carboxy ^{14}C (voir discussion pour l'utilisation de ces 2 échantillons d'inuline).

On laisse incuber sous atmosphère d'oxygène et en agitation mécanique constante pendant 60 minutes.

3 - Détermination du volume d'eau total

Au bout de 1 h15 d'incubation, on élimine le milieu et on essuie rapidement des adénohypophyses sur du papier légèrement imbibé de Krebs froid, puis on les met dans un creuset sec préalablement taré pour les peser.

On laisse le creuset dans l'étuve à 95° pendant toute la nuit et le matin on met l'étuve à 105°. On pèse le creuset de temps en temps jusqu'à ce que le poids reste le même entre 2 pesées. On obtient ce résultat après 33 heures à 105°.

.../...

4 - Détermination du volume d'eau extra-cellulaire (espace inuline)

a - Préparation de la fraction acido-soluble

Après incubation, les milieux M sont enlevés et gardés séparément pour la détermination ultérieure de la radioactivité de l'inuline.

Les fioles contenant les hypophyses sont gardées dans la glace et on va procéder à l'extraction une par une.

- On enlève l'hypophyse du fond de la fiole, on l'essuie rapidement sur du papier légèrement imbibé de Krebs froid, puis on la pèse.

- Ensuite, on l'homogénéise dans $HClO_4$ 0,3N , cet acide servant à précipiter les acides nucléiques, les protéines. Après chaque broyage, le Potter est rincé 2 fois avec H clO_4 0,3 N.

Pour les grosses hypophyses des rats adultes (supérieures à 3 mg), le broyage s'effectue dans 2 ml d'$HClO_4$ et le rinçage dans 2 fois 0,5 ml.

Pour les petites (inférieure à 3 mg), on broie dans 1 ml d'acide et on rince avec 2 fois 0,25 ml.

L'homogénat est alors centrifugé pendant 15 minutes à 5 000 tours/minute, puis on sépare le surnageant du culot que l'on élimine.

b - Détermination de la radioactivité

De chacun des surnageants S, on prélève 2 fois 100 µl qu'on met dans 2 fioles de comptage en plastique. On laisse évaporer une nuit sous vide dans un dessicateur contenant KOH en pastilles.

.../...

De chacun des milieux M, on prend 2 fois 5 µl qu'on met dans 2 fioles de comptage. L'évaporation n'est pas nécessaire.

Le contenu de chaque fiole (S = résidu de 100 µl ; M = 5 µl) est dissous dans 0,2 ml de hyamine puis on ajoute 10 ml de scintillateur composé de : 4 g PPO , 0,50 g diméthyl POPOP, 1 000 ml de toluène.

Les comptages sont réalisés à l'aide d'un compteur à scintillation (Nuclear Chicago Mark II) avec détermination des rendements par la méthode du standard externe.

5 - Calculs

a - Volume d'eau totale

La quantité d'eau totale exprimée en pourcentage du poids du tissu humide est donné par la relation suivante :

$$\frac{\text{Poids du tissu humide - Poids du tissu sec}}{\text{Poids du tissu humide}} \times 100$$

b - Volume extracellulaire

Après une heure d'incubation, la concentration en inuline, dans le liquide extracellulaire de l'hypophyse et celle du milieu, sont en équilibre.

On peut calculer alors le volume extracellulaire :

$$V \text{ extracellulaire (ml)} = \frac{\text{dpm Surnageant}}{\text{dpm/ml milieu}}$$

et par rapport au poids de tissu humide, on a :

$$\frac{V \text{ extracellulaire}}{\text{Poids du tissu humide}} \times 100$$

.../...

On l'exprime aussi par rapport à la quantité d'eau totale :

$$\frac{\text{Volume extracellulaire}}{\text{Volume d'eau totale}} \times 100$$

c - Calculs statistiques

Les résultats sont exprimés selon $m \pm t_{0,05} S_m$ (m = moyenne des mesures individuelles) ;

Les diverses séries sont comparées à l'aide du test de Student (calcul de t).

.../...

III - RESULTATS

1 - Volume d'eau totale

Les résultats sont consignés dans le tableau V. Il est apparent que les valeurs obtenues sont très voisines, qu'il s'agisse des animaux impubères ou adultes, normaux ou castrés.

Si l'on regroupe les rats de 27 et 29 jours, il ressort que le pourcentage d'eau totale des impubères normaux est de 81,6 % et celui des impubères castrés de 81,8 %. Si l'on regroupe les rats de 65 , 93 et 97 jours, le pourcentage d'eau totale des adultes normaux est de 82 % et celui des adultes castrés de 83,6 % (une seule mesure).

Nous retiendrons donc la valeur de 81,8 % (moyenne pour les rats normaux) qui correspond très exactement à celle reportée par TONGUE et YAMAMOTO (1967).

Il résulte de cette étude que le pourcentage d'eau totale de l'adénohypophyse ne change ni au cours de la croissance du rat, ni sous l'effet de la castration. L'hypertrophie de l'adénohypophyse qui se manifeste après gonadectomie correspond donc non seulement à une accumulation de protéines, mais également à une augmentation du contenu en eau totale.

2 - Volume d'eau extracellulaire

Les résultats de cette étude sont indiqués dans les tableaux VI, VIIa et VIIb. On constate (tableau VI) que l'incubation des glandes en présence d'inuline $\left[{}^{3}H\right]$ conduit à un volume extracellulaire de 32,2 à 34,6 % par rapport au poids de tissu humide. Il n'y a pas de différence significative entre les animaux impubères et adultes normaux, ou entre les impubères normaux ou castrés.

.../...

L'incubation des hypophyses en présence d'inuline-carboxy ^{14}-C (tableaux VIIa et VIIb) conduit à des valeurs sensiblement plus faibles (25,4 à 29,5 %). Dans ce cas également, on ne constate aucune différence statistiquement significative entre impubères et adultes, normaux et castrés.

.../...

IV - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nous discuterons tout d'abord brièvement les résultats et d'une manière plus importante l'aspect méthodologique.

1 - Résultats

En ce qui concerne le volume d'eau totale de l'adénohypophyse de rat, il n'y avait, à notre connaissance, au moment où nous avons commencé notre travail, qu'une seule valeur publiée, celle de TONOUE et YAMAMOTO (1967) qui indiquaient 81,8 %. Nous sommes donc en plein accord avec ces auteurs, bien que très récemment, SAMLI et collaborateurs (1971) aient trouvé cette grandeur égale à 79,2 ± 0,62 %. Quoi qu'il en soit, et étant donné la précision des résultats, nous avons adopté 81,8 % à la fois pour les animaux impubères et adultes, normaux et castrés. Si l'âge ou la gonadectomie influence ce paramètre, la modification n'est pas décelable par simple détermination de poids sec.

Le volume d'eau extracellulaire que nous avons retenu est celui obtenu avec l'inuline-carboxy $\left[^{14}C\right]$ (voir critique méthodologique). Si l'on ne tient compte que des animaux normaux, nous le trouvons égal à 27,8 % (exprimé par rapport au poids de tissu humide). SAMLI et collaborateurs (1971) qui utilisent également l'inuline $\left[^{14}C\right]$ indiquent la valeur 25,0 ± 2,3 %, ce qui est relativement proche de notre propre détermination. Là encore, nous ne trouvons aucune modification qui soit statistiquement significative entre impubères et adultes, normaux et castrés.

La valeur moyenne de l'espace inuline ainsi déterminé peut sembler relativement faible pour un tissu incubé ; il faut noter cependant que les adénohypophyses sont incubées entières et non en tranches (cf. critique méthodologique).

.../...

2 - Critique méthodologique

Pour déterminer le volume d'eau totale, la méthode employée est facile à appliquer, bien qu'il y ait l'étape délicate de l'essuyage des hypophyses après incubation. Néanmoins, les résultats obtenus sont reproductibles et satisfaisants.

La détermination du volume d'eau extracellulaire est beaucoup plus délicate. De nombreux facteurs influencent les résultats.

a - Pureté de l'inuline

LEVI (1969) a remarqué que les valeurs de l'espace inuline déterminées à partir d'échantillons d'inuline d'origine différente ne sont pas identiques. Il attribue ces variations au degré de dégradation plus ou moins important de ce polymère. Il faut noter en effet que cette détermination repose sur une imperméabilité complète des membranes cellulaires à ce polymère de fructose. Si l'échantillon est partiellement dépolymérisé jusqu'au stade fructose, il peut y avoir pénétration dans les cellules, d'où une détermination de l'espace inuline par excès.

Lors de nos premières expériences (séries a_2 et b_2, tableau VI) nous avons utilisé de l'inuline -^3H qui avait été conservé plus d'un an au congélateur. Le pourcentage d'eau extracellulaire par rapport au poids de tissu humide varie de 32,2 à 34,4 %.

Cette valeur nous ayant semblé élevée , nous avons décidé de tester l'homogénéité de notre échantillon d'inuline selon la technique chromatographique de LEVI (1969). Nous avons utilisé une colonne de Sephadex G50 (longueur : 90 cm ; diamètre : 1,5 cm). L'élution a été réalisée avec le tampon Tris-Hcl (0,05 M) dans Nacl (0,1 M), pH 7,5 et nous avons recueilli des fractions de 2 ml. La radioactivité de chaque fraction est déterminée par comptage d'une fraction aliquote dans un compteur Nuclear Chicago (Mark II), à l'aide du mélange scintillant de BRAY (1960).

.../...

Nous avons au préalable chromatographié sur cette même colonne nos échantillons de fructose pur et de bleu dextran pour déterminer à la fois la fin de chromatographie et le volume mort de la colonne. Le fructose a été révélé par coloration selon la méthode de SOMOGYI (1952). Les diverses chromatographies ont été réalisées à température ambiante.

La courbe d'élution de notre échantillon d'inuline $\left[^{3}H\right]$ est représentée sur la figure 4. On constate une très grande hétérogénéité avec une certaine quantité élevée au niveau du fructose. Cette inuline est donc fortement dépolymérisée.

L'analyse chromatographique de l'inuline $\left[^{14}C\right]$, réalisée dans les mêmes conditions, révèle par contre une grande homogénéité de distribution ; on ne décèle que des traces au niveau du fructose. Nous pouvons donc conclure que les résultats obtenus avec cet échantillon sont beaucoup plus proches de la réalité, et nous retenons donc les valeurs 25 à 29 % d'eau extracellulaire par rapport au poids de tissu humide.

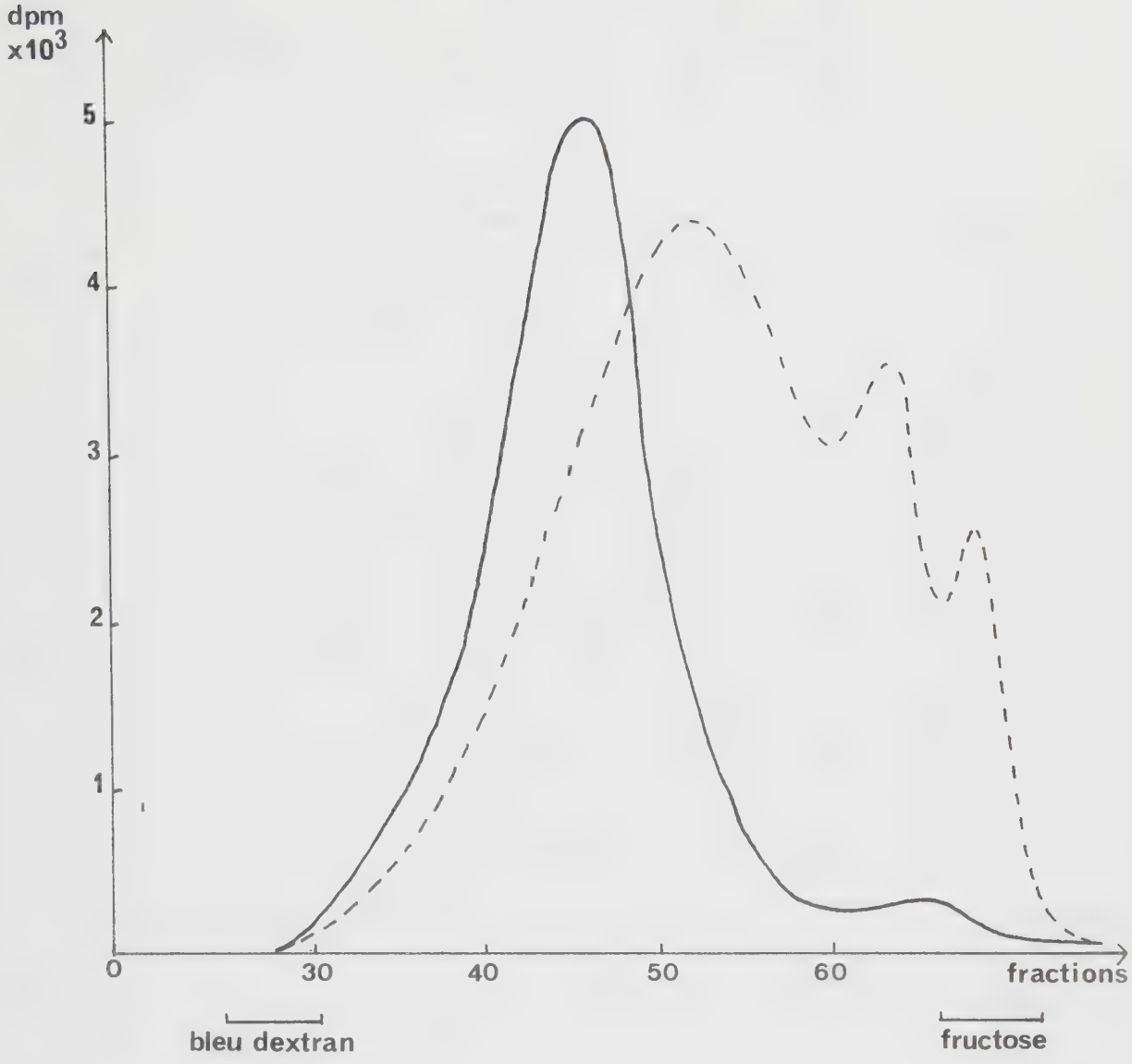
b - Prélèvement et essuyage des hypophyses

Grâce à l'utilisation d'inuline $\left[^{14}C\right]$, nous avons éliminé une cause d'erreur. La dispersion des résultats reste cependant très grande, ainsi qu'en témoigne la figure 5, dans laquelle nous avons représenté les valeurs individuelles de pourcentage d'eau extracellulaire ; nous constatons en effet des variations de 20 à 40 % selon les hypophyses.

Pour expliquer ces résultats, nous pensons que, au cours du prélèvement des hypophyses, certaines sont blessées et la perméabilité des cellules endommagées est altérée. LEVI et LATTES (1970), qui travaillent sur des coupes de cerveau de poulet, concluent que chaque coupure (surface située de part et d'autre d'une tranche) fait augmenter l'espace inuline d'environ 6 %.

.../...

FIGURE 4 - ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DE LA PURETE DES ECHANTILLONS D'INULINE UTILISES -

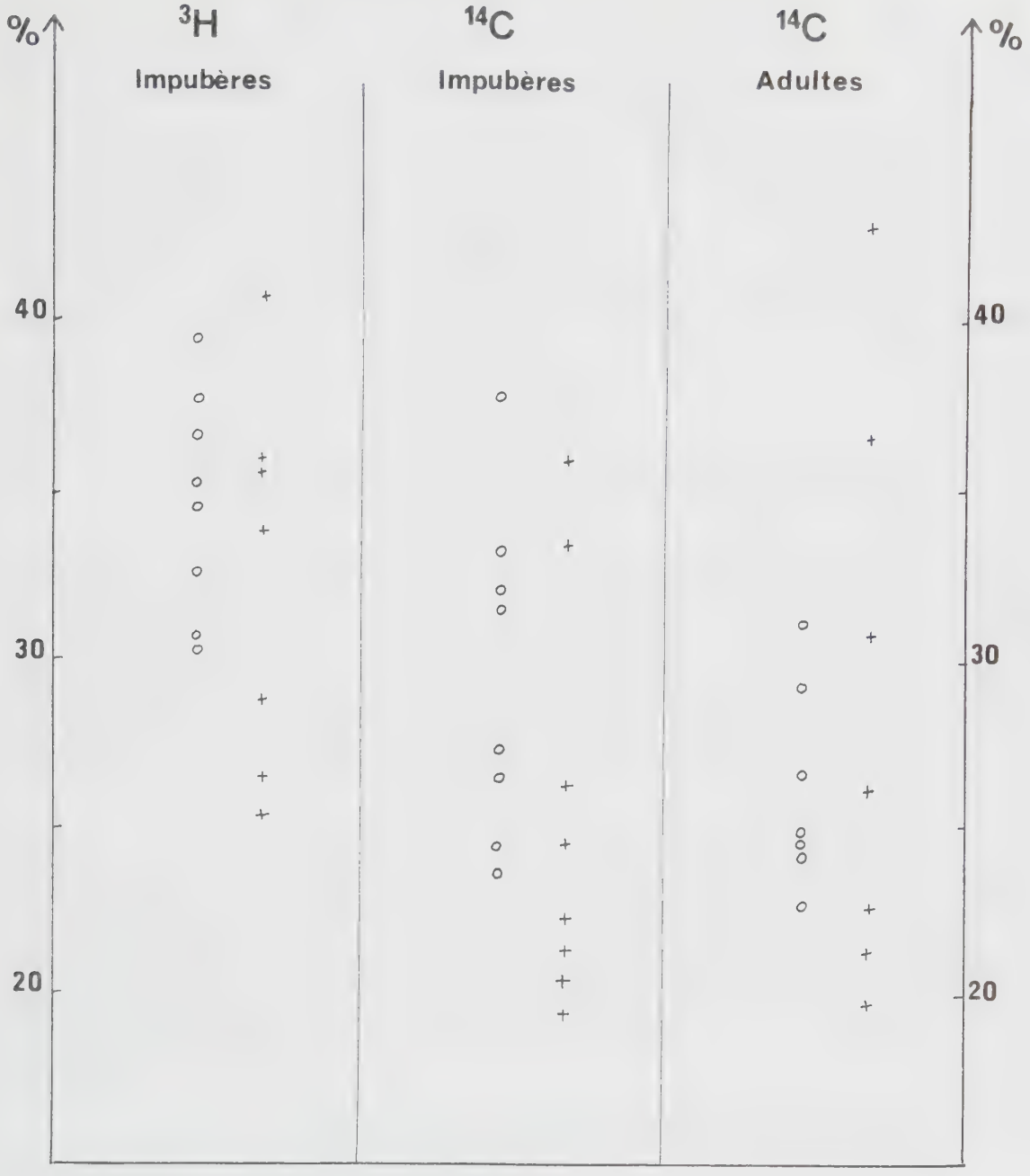


——— = Inuline carboxy ^{14}C

– – – = Inuline H^3

Eluat recueilli par fractions de 2 ml.

FIGURE 5 - DETERMINATION DU VOLUME D'EAU EXTRACELLULAIRE DE L'ADENOHYPOPHYSE DE RAT, A L'AIDE D'INULINE $\left[^{3}H\right]$ ou D'INULINE $\left[^{14}C\right]$



Résultats du volume d'eau extracellulaire en p.100 par rapport au poids de tissu humide.

o : rats normaux

+ : rats castrés

Nous mettons à incuber des glandes entières, et non des tranches, mais il est évident que l'inuline pénètre d'une manière plus importante dans les hypophyses endommagées.

Nous devons, de plus, tenir compte de l'essuyage des glandes après incubation en présence d'inuline. Il n'est pas question de rincer ces organes, car une fraction de l'inuline radioactive pourrait ressortir du liquide extracellulaire. Nous essuyons donc les hypophyses sur du papier filtre imbibé de liquide de Krebs froid, afin de drainer l'excès de liquide d'incubation qui adhère à la surface de l'organe. Lorsque l'on travaille sur une série de plusieurs glandes, l'essuyage est très certainement irrégulier, d'où des variations dans la quantité de radioactivité mesurée.

c - Quantité de radioactivité extracellulaire faible

Pour déterminer la radioactivité de la fraction acido-soluble, nous avons tout d'abord utilisé 0,100 ml de surnageant ; le nombre de coups/mn obtenus ne représente que 2 à 3 fois le bruit de fond, ce qui est très faible. Nous avons par la suite prélevé 0,200 ml, ce qui nous a permis d'avoir une précision supérieure, mais il est évident que l'erreur commise sur les comptages peut être de plusieurs pourcentages.

En conclusion, les déterminations d'eau totale et d'eau extracellulaire nous permettent d'affirmer que l'âge dè la castration n'altère pas les valeurs de ces paramètres. Il nous est donc maintenant possible d'absorber sans avoir à effectuer des corrections importantes, l'étude de la pénétration dans la cellule et de l'incorporation dans le RNA d'un précurseur des nucléotides pyrimidiques : l'acide orotique.

Nous envisagerons dans la 3ème partie l'influence de l'âge et de la castration sur ces paramètres.

.../...

TABLEAU V - DETERMINATION DU VOLUME D'EAU TOTALE DANS L'ADENOHYPOPHYSE DU RAT APRES INCUBATION-

Séries		Poids moyen des rats (g)	Poids des hypophyses après 1h15 d'incubation (mg)	Poids des hypophyses après 17h à 95° et 33h à 105° (mg)	Pourcentage d'eau (%)
Série a_1	Normaux, 65 j	250 (7)	40,55	7,65	81,1
	Normaux, 65 j	235 (8)	44,65	8,10	81,8
Série b_1	Normaux, 27 j	107 (10)	32,00	5,85	81,7
	Castrés, 20 j+ 7 j castration	105 (10)	36,20	6,60	81,8
Série c_1	Normaux, 93 j	313 (6)	36,90	6,00	83,7
	Castrés, 78 j+ 15 j castration	301 (6)	42,75	7,00	83,6
Série d_1	Normaux, 29 j	72,4 (10)	17,20	3,21	81,4
	Normaux, 97 j	339 (6)	40,68	7,68	81,2

TABLEAU VI : DETERMINATION DU VOLUME EXTRACELLULAIRE DE l'ADENOHYPOPHYSE DE RAT -

Les incubations sont réalisées en présence d'inuline ^{3}H

	Adultes (93j)	Impubères (29 j)	
		Normaux	Castrés (7j)
oids corporel (g)	365 (5)	73 (8)	70 (7)
oids hypophyse (mg)	8,12 ± 1,58	2,08 ± 0,23	2,56 ± 0,29
pm/100 µl surnageant	221	107	121
pm/5 µl milieu	12 700	11 243	11 182
olume extracellulaire (µl)	2,61 ± 0,69	0,71 ± 0,05	0,81 ± 0,07
au extracellulaire (%) / oids tissu humide	32,2 ± 7,2	34,6 ± 2,7	32,4 ± 5,3
au extracellulaire (%) / au totale	39,4 ± 9,8	42,4 ± 3,5	39,5 ± 6,5

- Entre parenthèses : nombres d'animaux
- Estimation des résultats : moyenne et intervalle de confiance à 95 % ; $m \pm t_{0,05} S_m$.

TABLEAUX VIIa et VIIb - DETERMINATION DU VOLUME EXTRACELLULAIRE DE l'ADENOHYPOPHYSE DE RAT

Les incubations sont réalisées en présence d'inuline-carboxy ^{14}C

	Impubères (30 j)	
	Normaux	Castrés (7 j)
Poids corporel (g)	89 (8)	81 (8)
Poids hypophyse (mg)	2,20 ± 0,23	2,69 ± 0,36
dpm/200 µl surnageant	210	224
dpm/10 µl milieu	24 150	24 700
Volume extracellulaire (µl)	0,65 ± 0,10	0,67 ± 0,11
Eau extracellulaire (%) / Poids tissu humide	29,5 ± 4,0	25,4 ± 5,2
Eau extracellulaire (%) / Eau totale	36,3 ± 4,8	30,9 ± 6,3

	Adultes (90 jours)	
	Normaux	Castrés (15 j)
Poids corporel (g)	360 (7)	254 (7)
Poids hypophyse (mg)	6,85 ± 0,88	7,13 ± 1,24
dpm/200 µl surnageant	290	325
dpm/10 µl milieu	24 024	24660
Volume extracellulaire (µl)	1,80 ± 0,29	1,98 ± 0,41
Eau extracellulaire (%) / Poids tissu humide	26,2 ± 2,9	28,5 ± 7,6
Eau extracellulaire (%) / Eau totale	32,1 ± 3,6	34,8 ± 9,7

- Entre parenthèses : nombres d'animaux
- Estimation des résultats : moyenne et intervalle de confiance à 95 % ; $m \pm t_{0,05} S_m$

TROISIEME PARTIE

INCORPORATION DE L'ACIDE OROTIQUE - ^{14}C DANS LE RNA DE L'ADENOHYPOPHYSE DE RAT

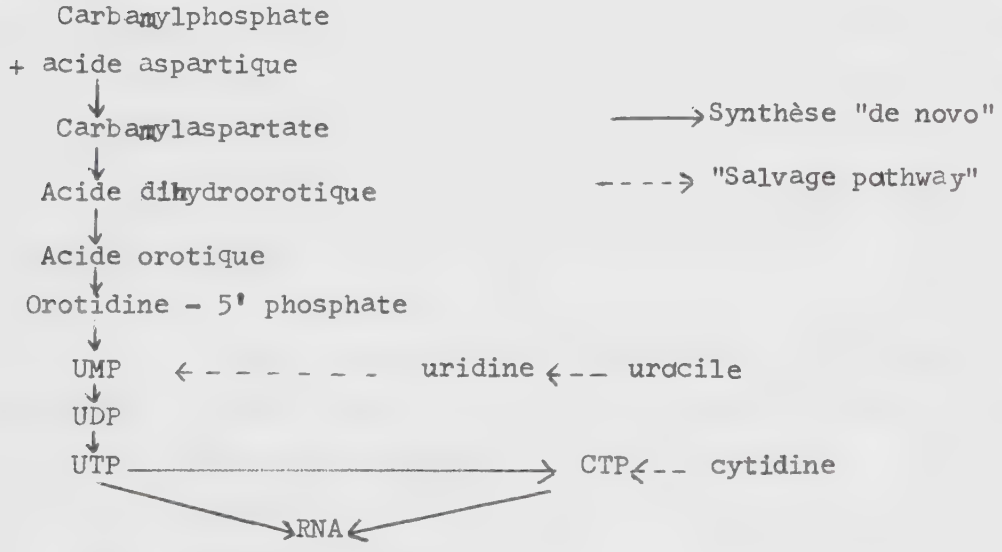
I - INTRODUCTION

Lorsque l'on désire étudier la biosynthèse du RNA dans une cellule, on peut utiliser un précurseur appartenant à l'une des deux voies principales de biosynthèse des nucléotides pyrimidiques suivantes :

- La voie de synthèse "de novo" qui conduit aux nucléotides pyrimidiques à partir du carbamylphosphate et de l'acide aspartique.

- La voie d'utilisation des bases ou des nucléosides ("Salvage pathway") qui conduit à ces mêmes nucléotides pyrimidiques à partir des bases (uracile et cytosine) ou des nucléosides (uridine et cytidine).

Nous pouvons schématiser les divers processus comme suit, sans entrer dans le détail des réactions enzymatiques :



.../...

Les précurseurs les plus couramment employés sont l'uridine et l'acide orotique, le premier étant préféré à cause de sa grande facilité de pénétration dans la cellule. Les nucléotides ne sont pas employés car les composés phosphorés traversent mal les membranes cellulaires.

Etant donné l'influence de la castration et de l'injection ultérieure de testostérone sur le développement de l'adénohypophyse de rat (voir 1ère partie et bibliographie correspondante), VALOTAIRE et collaborateurs (1969, 1970) avaient entrepris de déterminer l'effet de ces traitements sur la biosynthèse in vitro des acides nucléiques. Ils avaient utilisé comme précurseur l'uridine ^{3}H en ce qui concerne le marquage de RNA et la thymidine -^{3}H pour le DNA. Ils avaient choisi l'uridine sur la base des travaux de ZEMP et WILSON (1965) qui avaient montré que, in vivo, l'incorporation du précurseur dans le RNA de cerveau de rat était, dans l'ordre décroissant : uridine uracile acide orotique.

Contrairement aux résultats d'une étude préliminaire, VALOTAIRE et DUVAL (1970) ne trouvent aucune différence d'incorporation de l'uridine dans le RNA d'hypophyses de rats normaux ou castrés. Etant donné qu'il s'agissait de l'utilisation de la voie des nucléotides préformés, on pouvait penser que ce processus n'étant pas le processus général, une modification de biosynthèse pouvait se produire dans la voie de synthèse "de novo", éventuellement au cours de la transformation de l'acide orotique en uridine -5' phosphate.

Nous avons donc repris ces travaux en utilisant l'acide orotique ^{14}C comme précurseur, et nous nous sommes attachés à déterminer :

- la pénétration du précurseur dans la cellule
- la transformation de ce composé en nucléotides uridyliques
- son incorporation dans le RNA.

.../...

II - MATERIEL ET METHODES

1 - Animaux

Les animaux sont traités comme décrit précédemment (cf. 1ère partie). Nous utilons des rats de 10 jours (livrés au laboratoire avec leur mère), des rats de 28 jours normaux et castrés depuis 7 jours, des rats de 90 jours normaux et castrés depuis 14 jours. Ces durées de castration ont été choisies en fonction des études précédentes de VALOTAIRE et DUVAL (1970).

2 - Acide orotique $\left[^{14}C\right]$

L'acide orotique $\left[^{14}C\right]$ (en provenance du Commissariat à l'Energie Atomique) est partiellement dissous dans une solution de Nacl 0,1 M. La dissolution n'est complète qu'en ajoutant Hcl jusqu'à concentration finale 0,1 M (solutions mères).

Etant donné le grand nombre d'essais réalisés, nous avons utilisé deux échantillons d'acide orotique, le premier d'activité spécifique 34,7 mC/m môle , le second de 58 mC/m môle . Nous avons testé leur pureté radiochimique par électrophorèse à haute tension (appareil PHEROGRAPH), sur papier Whatman 3 MM, avec le tampon borate 0,02 M , pH 9 , à 3 500 volts (62 volts/cm , durée 35 mn). Les feuilles de papier sont découpées ensuite en bandes de 0,5 cm, et chaque bande est éluée avec H Cl (0,01 N). Les éluats sont alors comptés à l'aide du mélange scintillant de BRAY (1960) dans le compteur Nuclear Chicago (Mark II).

.../...

3 - Séries d'expériences

Nous avons réalisé 12 séries d'expériences réparties comme suit :

a - Etude générale

a.1. Incorporation de l'acide orotique en fonction de la concentration -

- Série 1 : rats normaux de 28 jours
- Série 2 : " " de 90 jours

a.2. Incorporation en fonction du temps d'incubation -

- Séries 3 et 3' : rats normaux de 28 jours
- Séries 4 et 4' : " castrés " " "
- Séries 5 et 5' : " normaux de 90 jours
- Séries 6 et 6' : " castrés " " "

b - Etude de la fraction acido-soluble = pourcentage des différents dérivés

- Séries 7 et 8 : rats normaux de 10 jours
- Séries 9 et 10: " " de 28 jours
- Séries 11 et 12: " " de 90 jours

c - Etude de la fraction RNA : proportion UMP - ^{14}C et CMP - ^{14}C

Cette étude est réalisée sur les rats des séries 9, 10, 11 et 12.

.../...

4 - Prélèvement de l'hypophyse et incubations

Les techniques de prélèvement et d'incubation sont semblables à celles employées pour déterminer le volume extracellulaire, soit schématiquement:

- prélèvement de l'hypophyse et élimination de la post-hypophyse ;

- préincubation de 10 mn dans le milieu de Krebs : une glande par fiole pour l'étude générale (séries 1 à 6) ; 10 glandes par fiole pour les rats de 10 jours (séries 7 et 8) ; 6 par fiole pour ceux de 28 jours (séries 9 et 10) ; 2 par fiole pour ceux de 90 jours (séries 11 et 12);

- élimination du liquide de préincubation et remplacement par du milieu frais ;

- addition de l'acide orotique $\left[-^{14}C\right]$: 1 à 18 µc pour l'étude a.1 , 4 µc pour l'étude a.2 , 8 µc pour les études b et c.

5 - Extraction et hydrolyse

La technique d'extraction est la même que lors de la détermination du volume extracellulaire. Après incubation, les hypophyses ne sont pas essuyées, mais rincées 3 fois avec du liquide Krebs froid avant homogénéisation dans $HClO_4$ 0,3 M. Les dosages de RNA et DNA dans l'étude générale a.1 et a.2 sont réalisés dans les mêmes conditions que lors de l'étude de l'effet de la testostérone (première partie).

Pour déterminer la transformation des nucléotides uridyliques en nucléotides cytidyliques et leur incorporation en tant que CMP, nous laissons l'hydrolyse de la fraction acido-insoluble se poursuivre pendant 15 heures à 37°, dans KOH 0,3N. Dans ces conditions, le RNA se trouve complètement hydrolysé en nucléosides-2'-(3') phosphates, à l'exception des très faibles quantités de dinucléotides contenant le groupement 2'-O-méthyl.

Les compositions du RNA et de la fraction acido-soluble sont déterminées par chromatographie et électrophorèse.

.../...

6 - Chromatographie et électrophorèses

a - Essais de séparation de l'acide orotique et des dérivés uridyliques par électrophorèse à haute tension

Nous avons essayé de trouver un tampon et des conditions opératoires qui permettent de séparer les 8 dérivés témoins suivants : uracile, uridine, acide orotique, orotidine-5' phosphate, uridine-5' phosphate, uridine-5' diphosphate, uridine-5' triphosphate, uridine diphosphoglucose (en tant que représentant du groupe des UDP-oses)

Nous avons utilisé l'électrophorèse à haute tension, sur papier Whatman n° 3MM, avec un certain nombre de tampons et les conditions opératoires suivantes :

- tampon glycine-Hcl	pH 2,0	0,05 M	4 500 V
- tampon acétate	pH 3,0	0,05 M	4 500 V
- tampon citrate	pH 2,85	0,1 M	2 600 V
- tampon citrate	pH 4,1	0,1 M	2 600 V
- tampon citrate	pH 5,1	0,1 M	2 400 V
- tampon borate	pH 9,0	0,01 M	3 800 V
- tampon borate	pH 9,0	0,02 M	3 400 V , 3 600 V , 3 800 V
- tampon borate	pH 9,0	0,05 M	2 400 V , 3 800 V , 4 000 V 4 500 V , 5 800 V
- tampon borate	pH 9,0	0,2 M	2 400 V

b - Essais de séparation par chromatographie

L'électrophorèse ne permettant pas de séparer l'uracile de l'uridine, nous avons testé un système chromatographique basé sur l'utilisation du solvant de FINK et collaborateurs (1963), à savoir : n-butonol - acide acétique -eau (2 : 1 : 1 , V/V). Les chromatographies ont été réalisées sur papier Whatman 3 MM, en technique descendante ou ascendante, dans une pièce thermostatée à 28°C. Cette température est nécessaire à un fractionnement correct.

.../...

c - Techniques retenues pour les différentes analyses

c.1. Fraction acido-soluble -

Nous utilisons en premier lieu l'électrophorèse en tampon citrate 0,1 M , pH 4,1 , à 2 600 V pendant 45 minutes. Nous pouvons ainsi estimer les pourcentages de UTP + OMP + UDP ; acide orotique + UDPG, UMP, uracile + uridine.

Nous utilisons parallèlement la chromatographie avec le solvant n-butonol-acide acétique-eau (2 : 1 : 1 , V/V), nous pouvons alors estimer les pourcentages d'uracile, d'uridine, d'acide orotique, d'UMP, et de l'ensemble UTP + UDPG + UDP + OMP.

c.2. Fraction RNA -

L'électrophorèse en tampon CH_3COOH 0,05 M + Li_2CO_3 0,002 M , pH 3,5 à 4 600 volts, pendant 45 mn permet de séparer les 4 nucléotides -2'(3') phosphates CMP, AMP, GMP, UMP (VALOTAIRE et collaborateurs, 1969). Nous pouvons alors calculer le taux de transformation des nucléotides uridyliques en nucléotides cytidyliques.

7 - Détermination de la radioactivité

a - Etude générale (a.1. et a.2.)

0,1 ml de chacune des fractions S, RNA et DNA sont prélevés et mis à sécher sous vide une nuit directement dans les fioles de comptage. Le résidu est dissous dans 0,2 ml d'hydroxyde de hyamine (PACKARD), et nous ajoutons 10 ml de mélange scintillant (4 g PPO , 0,50 g diméthyl POPOP, 1 000 ml de toluène).

b - Contrôle des fractions S et RNA (séries 7 à 12)

Les chromatogrammes et électrophorégrammes sont découpés en bandes de 0,5 cm de large ; chaque bande est éluée par Hcl 0,01 M directement dans les fioles de comptage. On ajoute ensuite 10 ml de mélange scintillant de BRAY, de composition : 4 g P.P.O ; 0,2 g POPOP ; 60 g Naphtalène ; 100 ml méthanol ; 20 ml d'éthylène glycol ; 880 ml de dioxane.

III - RESULTATS

1 - Analyse de l'acide orotique

Les deux échantillons d'acide orotique ont donné les profils de radioactivité représentés dans la figure 6.

Le premier échantillon semble pur, mais il présente une trainée assez importante; le second échantillon donne une tache bien délimitée, mais on trouve environ 5 % d'uracile comme impureté.

2 - Séparation de l'acide orotique et des différents dérivés

a - Electrophorèse

Les résultats obtenus avec les diverses conditions opératoires sont représentés dans la figure 7. Nous ne faisons cependant pas figurer les résultats correspondant aux tampons glycine-Hcl ou acétate, car nous n'obtenons que 3 taches pour 7 composés.

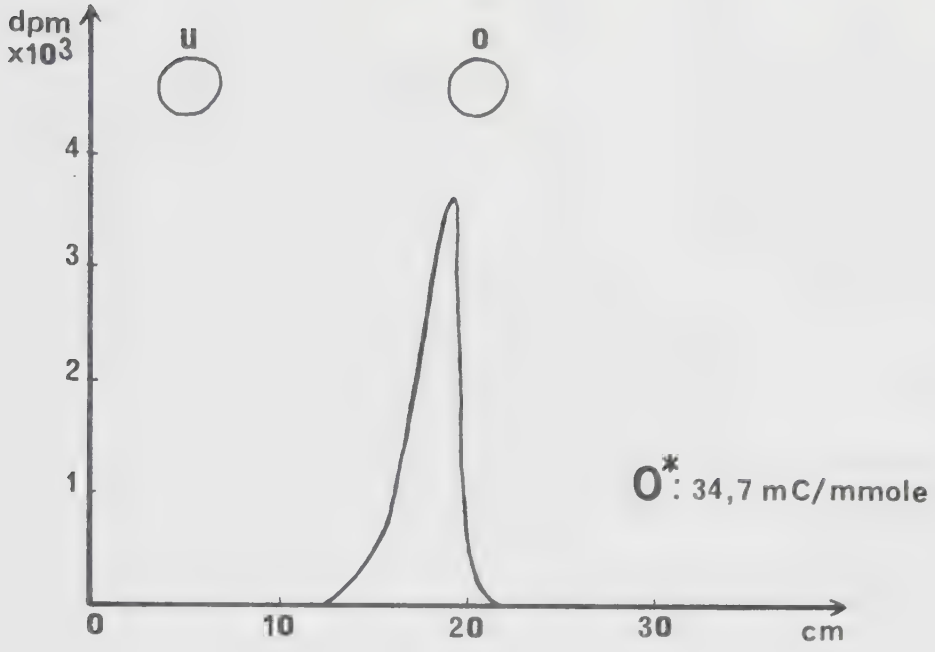
Dans le meilleur des cas, le tampon borate ne donne que 5 taches ; il n'est donc pas très intéressant. Nous pouvons conclure que le système qui nous donne les meilleurs résultats est celui à base de tampon citrate 0,1M pH 4,1 . Il n'est pas possible, cependant, de prolonger le temps de migration d'une manière importante, car il se produit alors un phénomène de diffusion, d'où un éloignement des différentes taches (trainées).

.../...

FIGURE 6 - ELECTROPHORESE DE L'ACIDE OROTIQUE [^{14}C] -

U : uracile

O : acide orotique



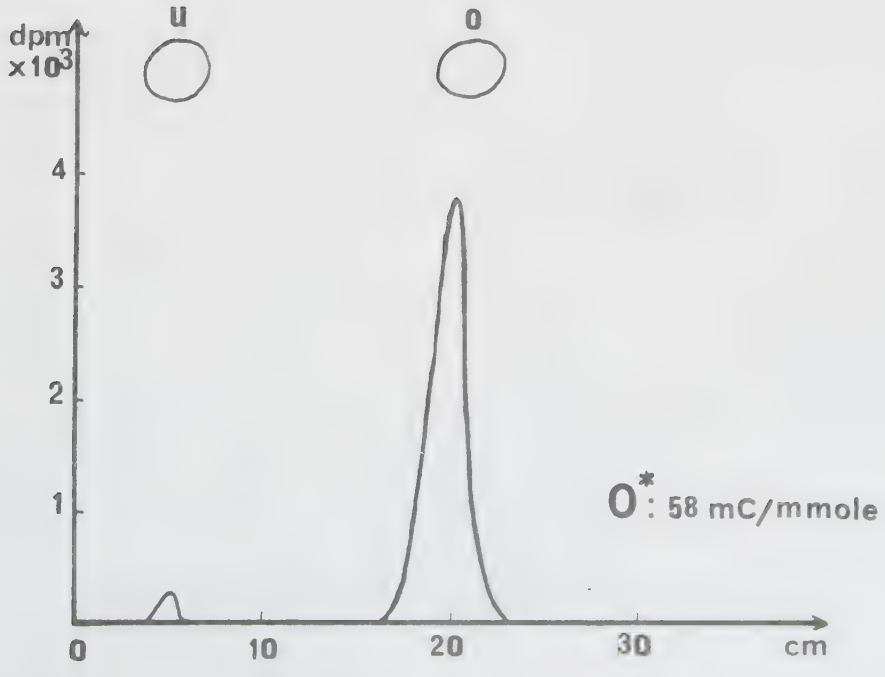
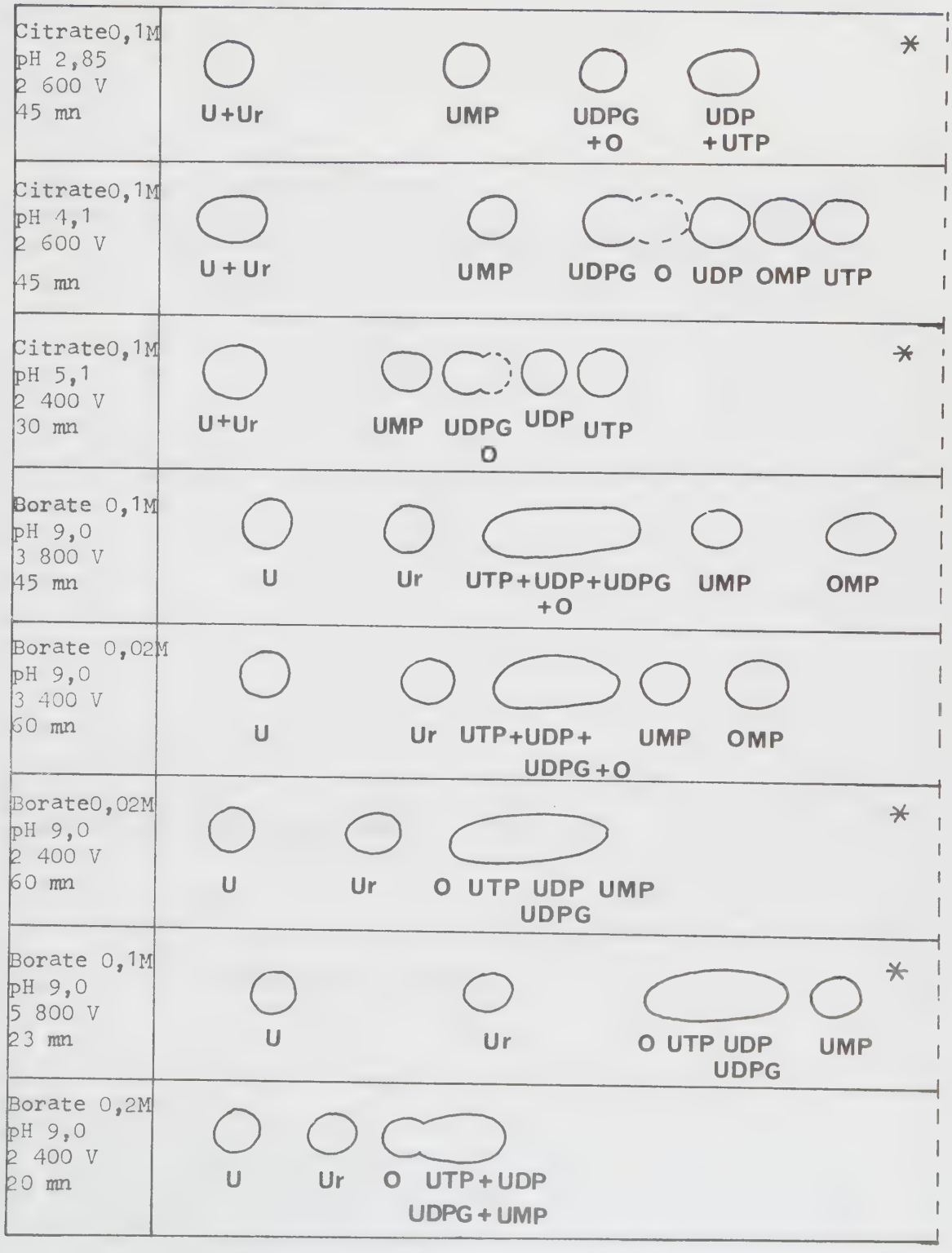


FIGURE 7 - SEPARATION DES DERIVES URIDYLIQUES ET OROTIDYLIQUES PAR ELECTROPHORESE HAUTE TENSION -

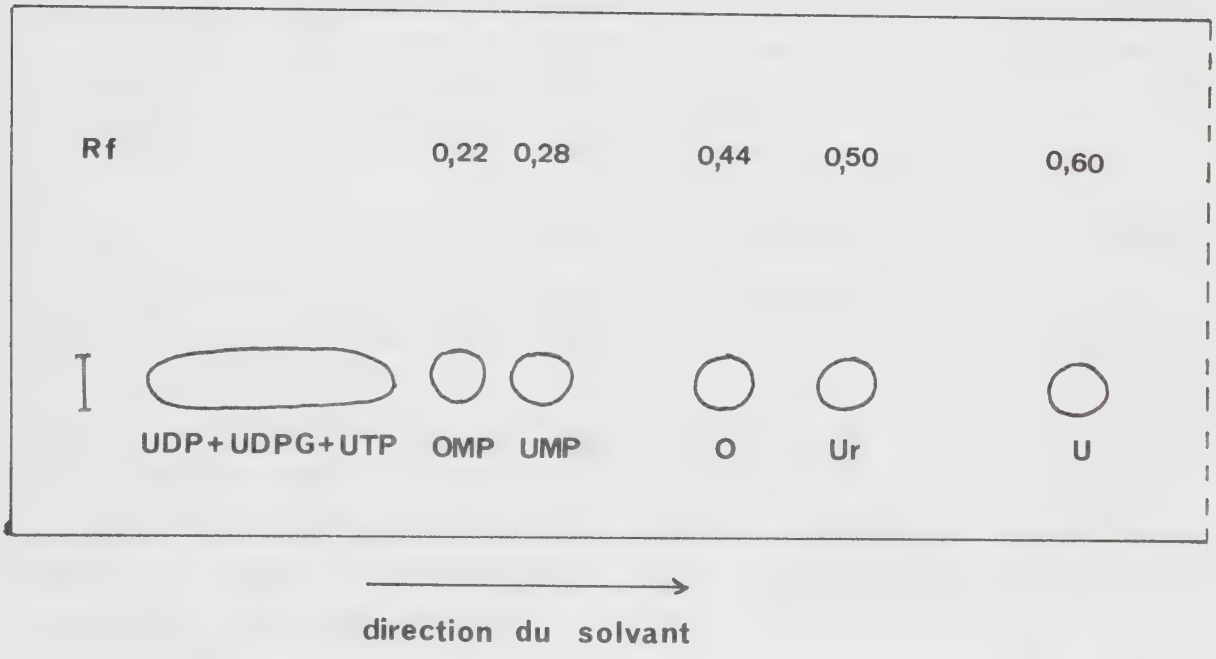


* L'orotidine -5' phosphate n'était pas encore disponible lorsque nous avons réalisé ces essais.

b - Chromatographie

Les divers essais ont porté sur la durée de migration (7h40 à 12 h) et non sur la nature du solvant. La meilleure résolution est obtenue pour 12 h de chromatographie, et les résultats sont représentés dans la figure 8 :

FIGURE 8 - SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES DERIVES OROTIDYLIQUES ET URIDYLIQUES EN CHROMATOGRAPHIE DESCENDANTE -



.../...

Nous avons essayé de limiter l'effet de traînée due aux nucléotides uridyliques en réalisant une chromatographie ascendante, Les essais n'ont cependant pas été concluants, la séparation étant dans l'ensemble moins bonne et la durée de migration trop longue (26 heures).

Dans de très nombreux cas, l'orotidine 5'-phosphate est très mal séparée du groupe des nucléotides uridyliques.

3 - Incorporation de l'acide orotique dans l'adénohypophyse en fonction de la concentration dans le milieu d'incubation

Les résultats de cette étude sont regroupés dans les tableau VIII.a (animaux impubères) et VIII.b (animaux adultes). Nous constatons que la pénétration dans les hypophyses (dpm S/mg hypophyse ou dpm S/µg DNA) n'est pas proportionnelle à la concentration de précurseur dans le milieu ; les courbes représentatives (non tracées) ont tendance à s'infléchir pour les fortes concentrations en acide orotique. Il en est de même pour l'incorporation de ce précurseur dans le RNA.

Au vu des résultats, il semblerait que l'acide orotique pénètre plus dans les hypophyses des animaux adultes que dans celles des impubères ; nous ne pouvons pas, cependant, comparer les valeurs absolues des deux séries, car les expériences ont été réalisées à plusieurs mois d'intervalles et de petites modifications de manipulations (vitesse de prélèvement des glandes, par exemple) peuvent éventuellement expliquer ces disparités. Si l'on regarde la proportion d'acide orotique incorporé dans le RNA par rapport à la radioactivité totale de l'organe, on n'observe pas de différences entre animaux impubères et adultes.

.../...

TABLEAU VIII.a - INCORPORATION DE L'ACIDE OROTIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DANS LA FRACTION ACIDO-SOLUBLE ET DANS LE RNA DE L'ADENOHYPOPHYSE DE RATS IMPUBERES (28 jours)

Acide orotique (µc/2 ml milieu)	1,05	2,25	5,00	9,80	18,50
dpm S/mg hypophyse	462	1 275	2 347	4 392	6 000
dpm S/µg DNA	78	194	365	700	1 080
dpm R/µg RNA	34	87	152	222	273
$\frac{\text{dpm RNA}}{\text{dpm S + dpm R}}$ (%)	23,6	27,2	26,7	21,6	16,4

TABLEAU VIII.b - INCORPORATION DE L'ACIDE OROTIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DANS LA FRACTION ACIDO-SOLUBLE ET DANS LE RNA DE L'ADENOHYPOPHYSE DE RATS ADULTES (88j)

Acide orotique (µc/2 ml milieu)	1,08	2,09	3,35	6,50	9,60	18,10
dpm S/mg hypophyse	815	1 891	2 268	3 196	6 834	10 278
dpm S/µg DNA	307	486	581	813	1 890	2 634
dpm R/µg RNA	52	100	134	174	325	403
$\frac{\text{dpm RNA}}{\text{dpm S + dpm R}}$ (%)	24,1	24,0	24,4	20,7	21,5	18,5

4 - Incorporation de l'acide orotique en fonction de la durée d'incubation

a - Pénétration dans l'hypophyse

Nous avons indiqué dans la partie "matériel" que nous avions utilisé deux échantillons d'acide orotique d'activité spécifique 34,7 mc/m môle et 58 m c/m môle.

Le premier est employé pour les séries 3 , 4 , 5 et 6 et le second pour les séries 3' , 4' , 5' et 6'. Les résultats des expériences 3 à 6 sont indiqués dans les tableaux IX et X. Nous constatons tout d'abord que pour le temps d'incubation 0 mn , une certaine quantité de radioactivité plus ou moins importante selon les cas figure dans la fraction acido-soluble. Ceci s'explique très facilement par le fait que le temps 0 représente en réalité quelques secondes ou quelques dizaines de secondes de contact entre la glande et le milieu radioactif qui est éliminé par aspiration et lavages successifs de l'hypophyse. Pendant ce temps, une certaine fraction de précurseur radioactif pénètre dans le liquide extracellulaire et éventuellement dans les cellules. Nous constatons cependant que pour ce temps 0 minutes, il n'y a pas encore incorporation de radioactivité dans le RNA (tableau X).

La précipitation du précurseur dans la glande n'est pas proportionnelle à la durée d'incubation ; nous observons (figures 9.a et 9.b séries 3' à 6') que la courbe représentant la quantité d'acide orotique qui a pénétré dans l'hypophyse s'infléchit légèrement lorsque la durée d'incubation se prolonge.

Nous remarquons que la quantité d'acide orotique qui pénètre par mg d'hypophyse est très voisine pour les 4 groupes d'animaux impubères et adultes, normaux et castrés.

.../...

TABLEAU IX : CINETIQUE DE PENETRATION DE L'ACIDE OROTIQUE DANS LES ADENOHYPOPHYSES DE RATS IMPUBERES ET ADULTES, NORMAUX ET CASTRES (Séries 3, 4, 5 et 6)

Durée d'incubation (minutes)		0	15	30	60	90	120	150
dpm / mg Hyp.	I.N. (*)	608	1 369	1 935	2 410	-	3 747	-
	I.C.	793	1 541	1 879	2 295	-	3 877	-
	A.N.	204	1 389	1 229	3 144	-	5 292	-
	A.C.	1 033	1 631	2 272	2 587	3 276	-	5 271
dpm / µg DNA	I.N.	81	198	319	384	-	586	-
	I.C.	149	262	324	432	-	699	-
	A.N.	69	419	414	1 169	-	1 757	-
	A.C.	380	464	609	828	1 116	-	1 538

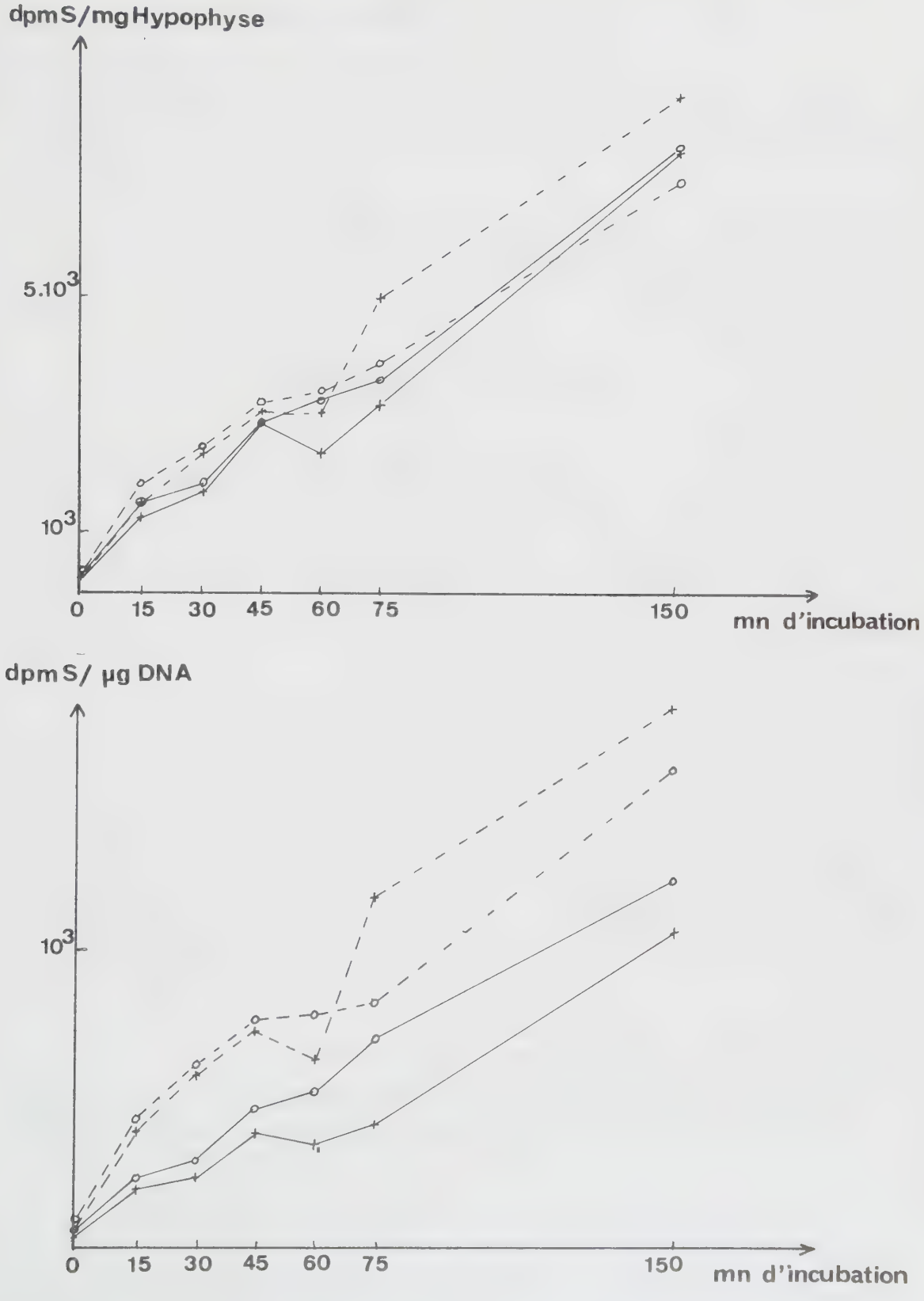
(*) I.N. = rats impubères normaux
I.C. = " " castrés
A.N. = " " normaux
A.C. = " " castrés

TABLEAU X - CINETIQUE D'INCORPORATION DE L'ACIDE OROTIQUE DANS LE RNA DES ADENOHYPOPHYSES DE RATS IMPUBERES ET ADULTES, NORMAUX ET CASTRES (séries 3, 4, 5 et 6)

Durée d'incubation (minutes)		0	15	30	60	90	120	150
dpm / µg RNA	I.N. (*)	3	25	55	132	-	254	-
	I.C.	0	29	53	96	-	213	-
	A.N.	0	22	-	149	-	315	-
	A.C.	2	18	111	193	242	-	391

(*) mêmes significations que pour le tableau IX

FIGURE 9 - CINETIQUE DE PENETRATION DE L'ACIDE OROTIQUE DANS LES HYPOPHYSES DE RATS IMPUBERES ET ADULTES, NORMAUX ET CASTRES (séries 3', 4', 5' et 6')



+ —— + rats impubères normaux

o —— o rats impubères castrés

+ - - - + rats adultes normaux

o - - - o rats adultes castrés

Lorsque l'on exprime cette pénétration par µg de DNA, nous constatons qu'il y a une plus grande quantité de précurseur radioactif par cellule chez les animaux adultes. Cette différence s'explique par le fait que la masse cellulaire moyenne des hypophyses de rats adultes est plus importante que celle des jeunes, ou encore que le taux de DNA (µg DNA/mg hypophyse) est inférieur, ainsi que l'ont montré VALOTAIRE et DUVAL (1969), observation que nos dosages ont confirmée.

Nous avons indiqué dans la première partie de ce travail qu'il y avait deux moyens d'exprimer la pénétration d'un composé dans une cellule :

- le rapport $\frac{\text{concentration intracellulaire}}{\text{concentration du milieu}}$

- le rapport $\frac{\text{radioactivité / g tissu}}{\text{radioactivité / ml milieu}}$

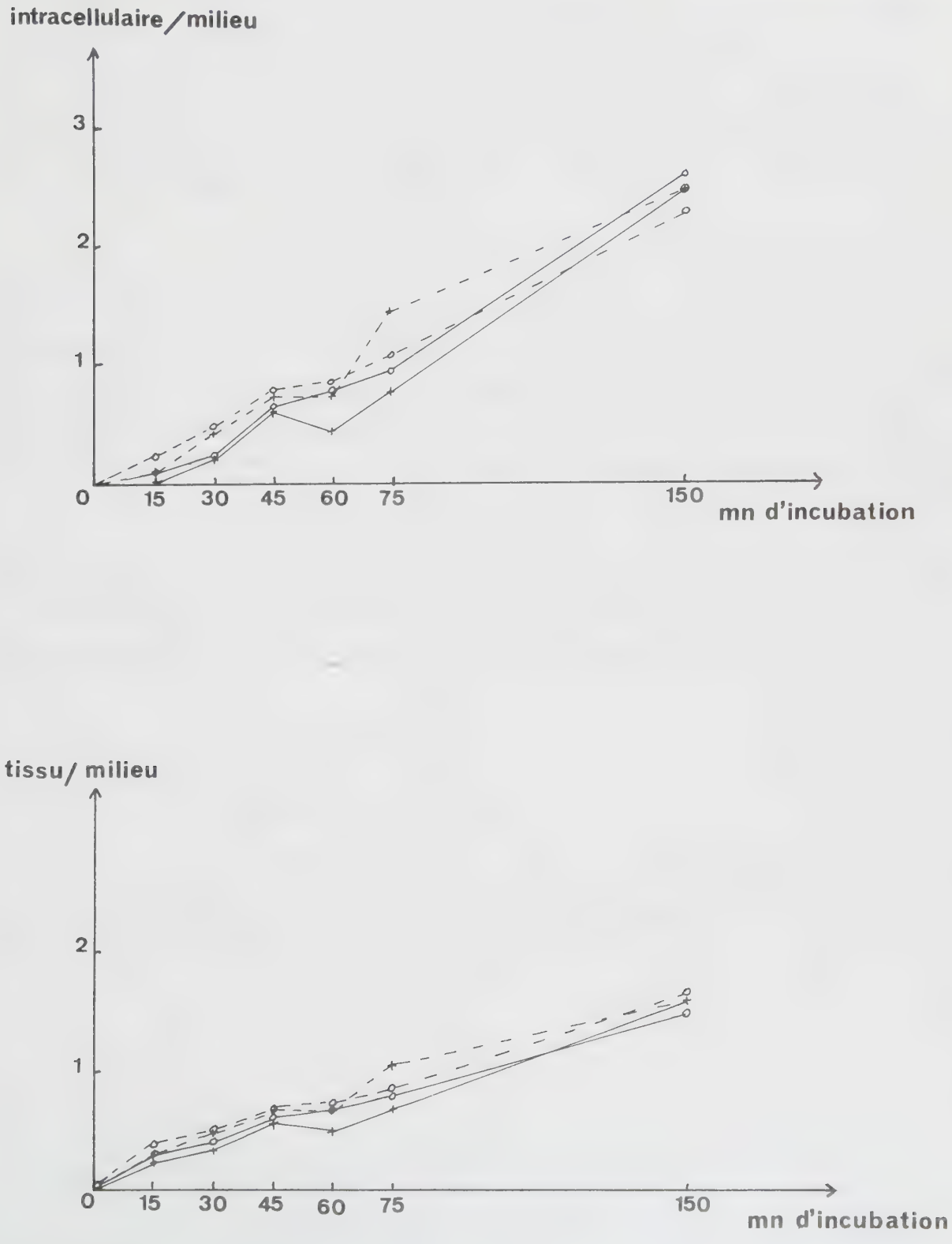
Nous avons déterminé ces deux types de valeurs en utilisant les données de la deuxième partie de ce travail, à savoir le pourcentage d'eau totale et le volume extracellulaire.

Les résultats de ces calculs sont représentés dans les figures 10a et b, pour les séries d'expériences 3' à 6'. Ils nous montrent que la pénétration de l'acide orotique dans l'adénohypophyse est lente, la valeur 1 pour l'un et l'autre rapport n'étant atteinte que pour 75 et 90 minutes. Il n'y a donc pas concentration de l'acide orotique dans la cellule aux dépens du milieu d'incubation. Le phénomène de pénétration est donc fort probablement essentiellement un processus de diffusion passive à travers la membrane et non un transport actif.

Nous pouvons conclure de cet ensemble d'études que la pénétration de l'acide orotique dans les adénohypophyses en incubation est identique pour les animaux impubères et adultes, normaux et castrés.

.../...

FIGURE 10 - CINETIQUE DE PENETRATION DE L'ACIDE OROTIQUE DANS LES ADENOHYPOPHYSES DE RATS IMPUBERES ET ADULTES, NORMAUX ET CASTRES (séries 3' , 4' , 5' et 6')



b - Incorporation dans le RNA

Les résultats des séries 3 à 6 (tableau X) montrent que l'incorporation de l'acide orotique dans le RNA est à peu près proportionnelle à la durée d'incubation. Nous constatons (figure 11) qu'il en est de même pour les expériences des séries 3' à 6'. Il semble cependant qu'il y ait un court temps de latence de quelques minutes avant que le précurseur ne s'incorpore dans le RNA. Il est probable que ces quelques minutes correspondent à la suite de réactions : acide orotique ⟶ orotidine-5' phosphate ⟶ UMP ⟶ UDP ⟶ UTP ⟶ RNA.

On peut se demander quel pourcentage de la radioactivité totale est incorporée dans le RNA, et si on atteint assez rapidement un équilibre entre le pool des nucléotides et le RNA. VALOTAIRE et collaborateurs (1969) avaient en effet montré lors d'incubations d'hypothalamus et de cortex cérébral de rat que le pourcentage d'incorporation dans le RNA atteignait rapidement un plateau au bout d'environ 30 à 60 minutes, et que les valeurs obtenues étaient de 8 % et 4 % pour l'hypothalamus et le cortex cérébral respectivement.

En ce qui concerne l'acide orotique, nous constatons (figure 12) que le plateau est atteint vers 45-60 minutes, et que le taux de transformation est compris entre 20 et 25 %. La valeur de ce plateau est identique pour les rats impubères et adultes, normaux et castrés.

c - Incorporation dans le DNA

Nous n'avons pas trouvé de radioactivité dans le DNA, donc le taux de transformation des ribonucléotides en désoxyribonucléotides doit être négligeable pendant la durée de l'incubation.

.../...

FIGURE 11 - INCORPORATION DE L'ACIDE OROTIQUE - ^{14}C DANS LE RNA DE L'ADENOHYPOPHYSE DE RATS IMPUBERES ET ADULTES, NORMAUX ET CASTRES

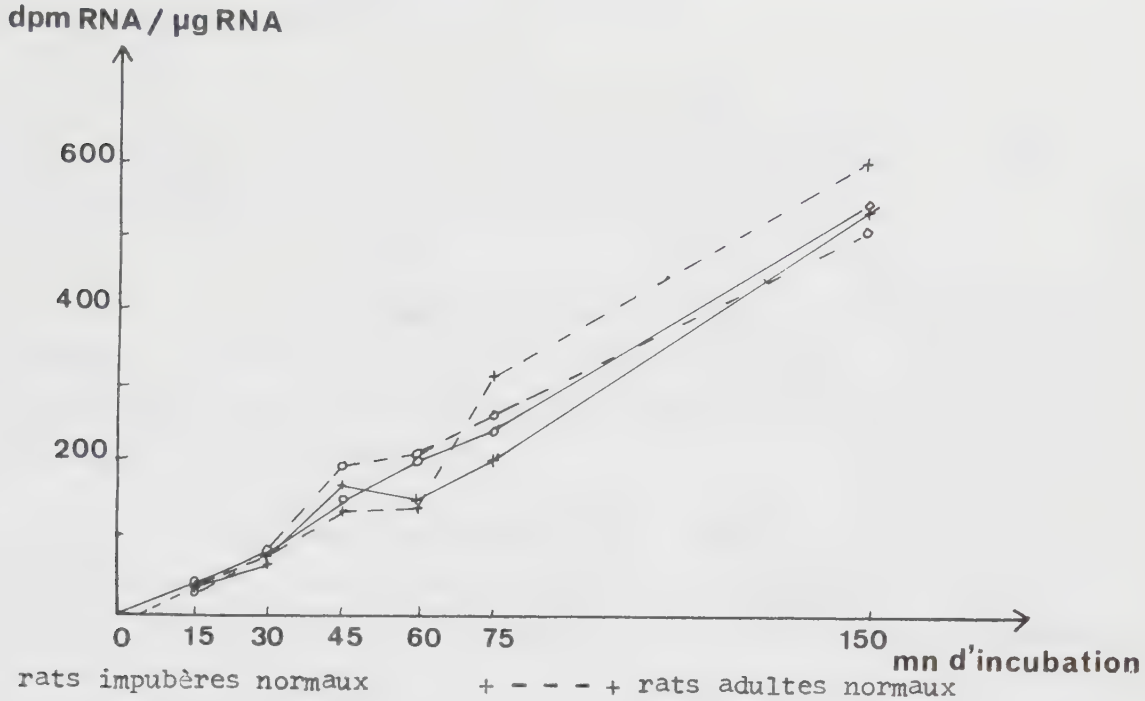
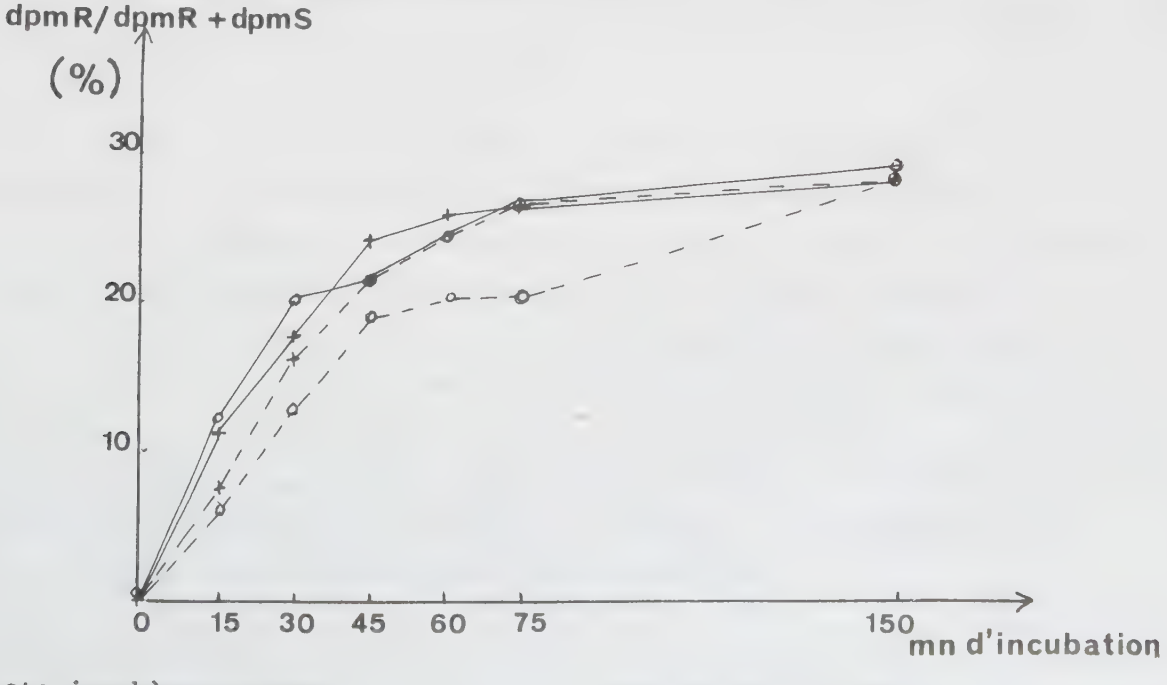


FIGURE 12 - POURCENTAGE D'INCORPORATION DE LA RADIOACTIVITE DANS LE RNA PAR RAPPORT A LA RADIOACTIVITE TOTALE DU TISSU -



5 - Analyse de la fraction acido-soluble. Transformation de l'acide orotique (séries 7 à 12)

La figure 13 représente le profil de radioactivité d'un électrophorégramme (série 10) et d'un chromatogramme (série 7). Ces profils sont importants pour la discussion ultérieure.

Nous avons indiqué dans le tableau XI les résultats correspondant à l'ensemble des séries. Les valeurs obtenues, exprimées pour chaque composé en pourcentage de la radioactivité totale, sont très voisines, quel que soit l'âge des animaux.

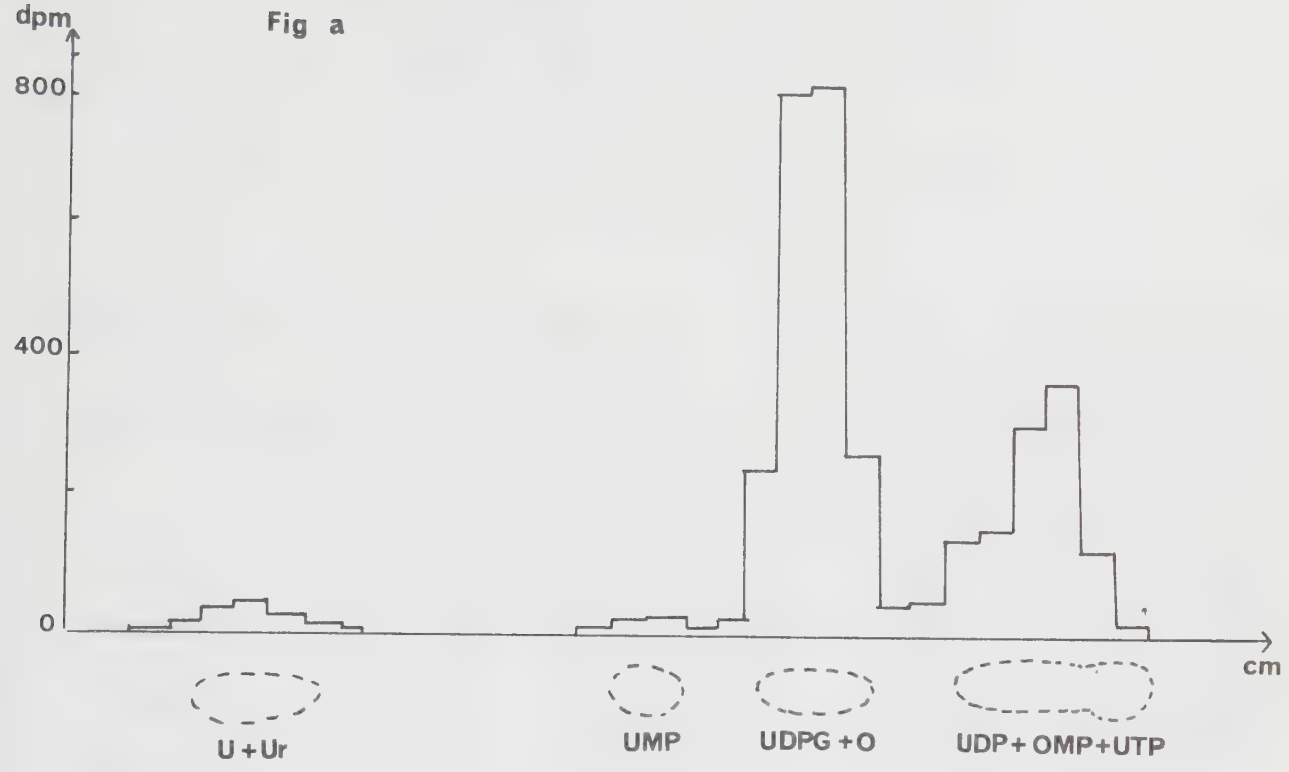
En ce qui concerne l'acide orotique, qui n'est bien isolé que par chromatographie, nous en trouvons, selon les expériences, 6,1 à 12,9 %. Ce taux très faible nous montre que le précurseur est immédiatement transformé dès sa pénétration dans la cellule. Ce taux résiduel de 10 % correspond probablement en majeure partie à l'acide orotique contenu dans l'espace extracellulaire.

Selon la voie de synthèse "de novo", l'acide orotique est transformé en orotidine-5' phosphate. Or, l'OMP n'est pas toujours parfaitement séparé du groupe UDP + UTP + UDPG et son estimation est parfois délicate. Cependant, lorsque la chromatrographie est très bonne et les taches bien délimitées, nous ne trouvons que des traces de radioactivité, non dosables d'une manière quantitative.

Lors de la réaction suivante, il se forme de l'UMP. Les résultats de l'électrophorèse nous montrent que ce composé est présent en très petites quantités, de l'ordre de 0,5 à 2,0 %. Il peut être surprenant de trouver par chromatographie des valeurs très variables, allant de 2,7 à 25,7 %. Nous nous sommes en fait aperçus qu'une partie des nucléosides di et triphosphates (UDP, UDPG, UTP) peut se dégrader rapidement au moment où l'on dépose la partie aliquote sur le papier. A ce stade, en effet, il faut sécher le papier et comme le milieu est acide ($HClO_4$ 0,3 M), il se produit une concentration en acide d'où une hydrolyse partielle. Ce phénomène ne peut se produire lors du dépôt pour l'électrophorèse.

.../...

FIGURE 13 - PROFILS DE RADIOACTIVITE OBTENUS PAR ELCTROPHORESE (a) OU CHROMATOGRAPHIE $(b)_2$ DE LA FRACTION ACIDOSOLUBLE DE L'ADENO-HYPOPHYSE INCUBEE EN PRESENCE D'ACIDE OROTIQUE - ^{14}C.



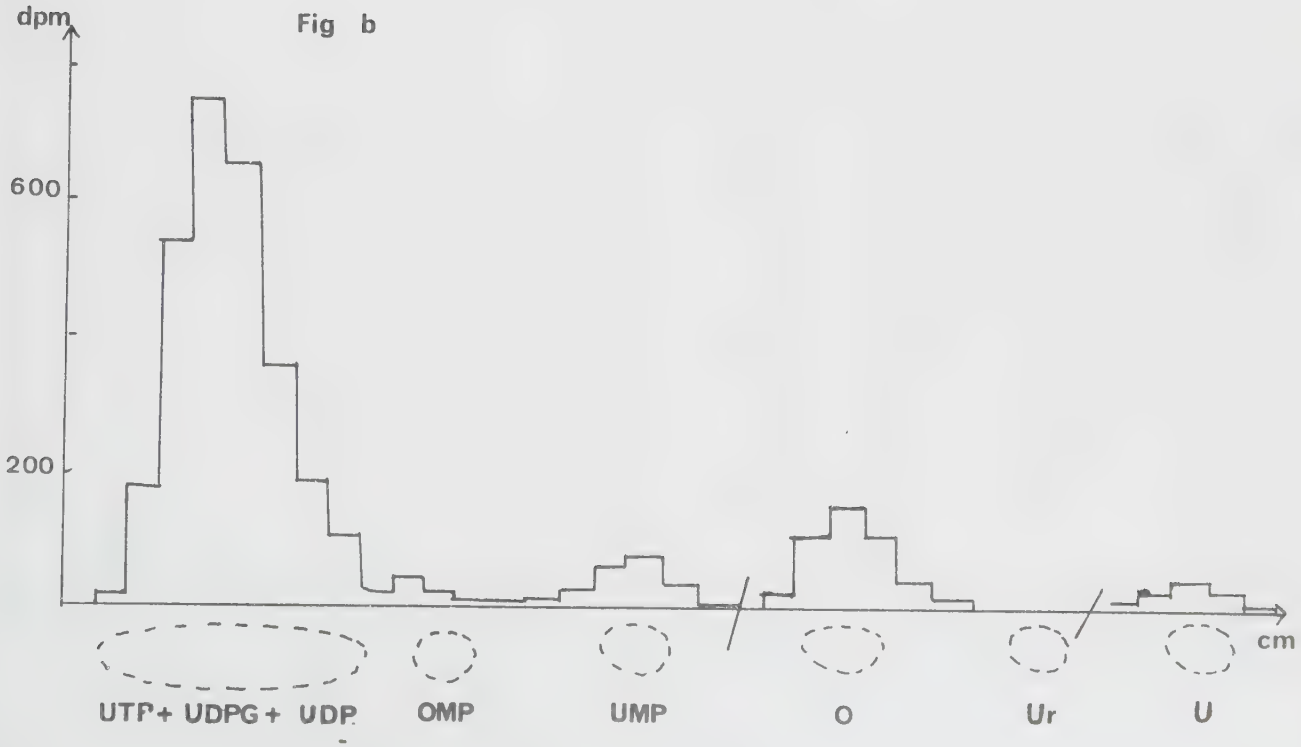


TABLEAU XI - POURCENTAGES DES DIFFERENTS DERIVES OROTIDYLIQUES ET URIDYLIQUES DANS LA FRACTION ACIDO-SOLUBLE DE L'ADENOHYPOPHYSE, ANALYSEE PAR ELECTROPHORESE ET CHROMATOGRAPHIE -

Dérivés \ Age	10 jours	28 jours	90 jours
	ELECTROPHORESE		
U + UR	7 7,6	4,4 4,8	3,1 5,0
UMP	0,9 2,0	1,4 1,6	0,5 1,9
O + UDPG	47,6 53,2	49,2 41,8	47,8 60,3
UDP + OMP + UTP	44,5 40,0	45,0 51,7	48,5 32,8
	CHROMATOGRAPHIE		
UDP + UTP + UDPG + OMP	82,2 78,7	62,6 78,5	67,1 81,8
UMP	2,7 4,5	25,7 13,4	19,0 4,8
O	8,1 12,9	11,0 6,1	12,6 11,0
UR	0 0	0 0	0 0
U	7,0 4,0	0,6 1,9	1,2 2,3
UDPG (recalculé)	39,5 40,3	38,2 35,7	35,2 49,3

L'étape suivante correspond à la transformation de l'UMP en UDP puis UTP. Le pic principal de radioactivité se situe au niveau de la fraction UTP alors qu'il y en a peu au niveau de l'UDP. L'OMP se situant cependant au milieu des deux composés précédents, nous avons estimé l'ensemble UDP + OMP + UTP. Il représente de 32,8 à 51,7 %. VALOTAIRE et DUVAL (1970) ayant montré qu'il n'y a que des traces d'UDP dans la fraction acido-soluble de l'adénohypophyse, il est probable que ce pic correspond presque exclusivement à l'UTP.

L'acide orotique s'est donc transformé essentiellement en UTP, mais une autre réaction intéressante se produit. C'est celle qui correspond à la formation d'UDP-oses, et notamment à un (ou plusieurs) composés qui migrent au niveau de l'UDP-glucose. L'électrophorèse donne le pourcentage UDPG + acide orotique. Si nous soustrayons la valeur de l'acide orotique déterminée par chromatographie, l'UDPG représente 35,2 à 49,0 % de la radioactivité totale, ce qui est considérable.

Il faut enfin penser à une dégradation éventuelle des nucléotides en uridine et urocile. Nous n'avons jamais retrouvé d'uridine par chromatographie. Nous en concluons qu'il n'y a pas déphosphorylation de l'UMP au cours de notre incubation. Nous observons, par contre, en électrophorèse 3,1 à 7,6 % d'urocile + uridine. Ceci ne peut donc correspondre qu'à de l'urocile. Il ne s'agit là probablement pas d'une transformation de l'UMP, car nous avons signalé que l'acide orotique utilisé contenait environ 5 % d'urocile, et ce dernier peut également pénétrer dans les cellules. Nous en trouvons un pourcentage plus faible dans les chromatogrammes, mais il est possible que ce soit simplement dû au fait que l'urocile migre le plus loin dans ce système analytique (Rf. = 0,63) et la tache peut être relativement diffuse.

.../...

6 - Analyse du RNA synthétisé au cours de l'incubation

L'élution des taches obtenues après électrophorèse de l'hydrolysat alcalin du RNA met en évidence 2 pics de radioactivité. Le plus important d'entre eux (88 à 90 %) coïncide avec la tache de l'uridine -2' (3') phosphate, le second (10 à 12 %) coïncide avec la tache de la cytidine-2' (3') phosphate. Les valeurs sont identiques quel que soit l'âge des animaux.

Nous pouvons ainsi conclure, en admettant en première approximation que les taux d'incorporation du CMP et de l'UMP sont identiques dans le RNA, qu'environ 10 % de l'UTP provenant de l'acide orotique est transformé en CTP dans la fraction soluble.

.../...

IV - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1 - Comparaison acide orotique - uridine

Il ressort de notre étude que l'acide orotique peut servir de précurseur pour étudier la biosynthèse in-vitro du RNA de l'adénohypophyse. Cette molécule pénètre dans les cellules semble-t-il par un simple phénomène de diffusion. Après 90 minutes d'incubation, les rapports tissu/milieu sont environ égaux à 1, alors que VALOTAIRE et collaborateurs (1969) ont trouvé, pour cette même durée d'incubation en présence d'uridine, un rapport compris entre 2,2 et 3,2 selon les expériences. La pénétration de l'acide orotique est donc plus faible que celle de l'uridine.

Cette pénétration plus faible ne signifiait pas pour autant que l'acide orotique pouvait être un moins bon précurseur. En effet, l'incorporation de l'acide orotique ou de l'uridine dans le RNA est fonction de la formation des nucléotides uridyliques, le premier par la voie de synthèse "de novo", le second par le "salvage pathway" qui nécessite au préalable la phosphorylation de l'uridine par une uridine kinase. L'utilisation de ces deux voies par les cellules de l'adénohypophyse pouvait être très différente. En fait, ces deux voies sont utilisées d'une manière importante, car les deux précurseurs sont immédiatement transformés dès leur entrée dans la cellule. Les "pools" intracellulaire d'acide orotique et d'uridine sont probablement très faibles. On peut donc s'attendre à ce que le pourcentage de radioactivité incorporée dans le RNA par rapport à la radioactivité totale soit le même, quel que soit le précurseur, étant donné que le seul "pool" uridylique important est constitué par l'UTP et l'UDPG, composés communs aux deux voies de biosynthèse. VALOTAIRE et collaborateurs (1969) ont indiqué une valeur comprise entre 26 et 34 % après 90 minutes d'incubation; l'examen de la figure 12 montre que nous obtenons une valeur comprise entre 22 et 27 %, ce qui représente un bon accord entre les deux groupes d'expériences.

.../...

Nous pouvons donc, en première conclusion, indiquer que l'acide orotique est un aussi bon précurseur que l'uridine en ce qui concerne son incorporation dans le RNA ; il a cependant comme inconvénient de pénétrer moins facilement dans les cellules, d'où son emploi plus restreint.

L'acide orotique est transformé en nucléotides uridyliques ; les taux de transformation en UDPG et UTP correspondent approximativement à ceux indiqués par VALOTAIRE et DUVAL (1970). La différence réside dans le fait qu'ils trouvent 4 à 8 % d'uridine, mais celle-ci correspond certainement au précurseur contenu dans le volume extracellulaire, de même que l'acide orotique dans nos propres expériences.

2 - Comparaison rats impubères - rats adultes

Nous avons constaté que les rats adultes captent une plus grande quantité d'acide orotique par cellule (dpm S/µg DNA) que les animaux impubères; par contre, l'activité spécifique du RNA est sensiblement identique. On peut imaginer alors que l'activité spécifique de "pool" des nucléotides libres est une activité de biosynthèse du RNA par le RNA polymérase-DNA dépendante identique. VALOTAIRE et DUVAL (1970) avaient indiqué, dans le cas de l'uridine, une activité spécifique du RNA plus faible pour les rats adultes, mais on remarque dans leurs expériences que la pénétration du précurseur par cellule est voisine pour les deux types d'animaux. Il est probable que, dans leurs expériences, l'activité spécifique du "pool" des nucléotides est plus faible pour les rats adultes, ce qui entraîne, pour une activité RNA-polymérase-DNA dépendante égale, une diminution de l'activité spécifique du RNA. Les deux groupes d'expériences, bien que donnant des résultats sensiblement différents, sont donc compatibles.

.../...

3 - Comparaison rats témoins - rats castrés

Nous avons vu que la castration des rats se traduit par une élévation des quantités de DNA, RNA et protéines de l'adéno-hypophyse. D'une manière générale, s'il pénètre une plus grande quantité d'acide orotique par glande d'animal castré, la concentration intracellulaire reste voisine pour les deux types d'animaux ainsi qu'en témoignent les courbes dpm/mg tissu, dpm/µg DNA, ou encore tissu/milieu.

La castration n'a aucun effet également sur la transformation du précurseur en nucléotides uridyliques, les taux des divers composés étant identiques entre normaux et castrés. Il en est de même pour l'incorporation dans le RNA, et ce phénomène a déjà été signalé par VALOTAIRE et DUVAL (1970) avec l'uridine. On serait donc tenté de penser que la biosynthèse du RNA n'est pas modifiée par la castration. Il faut en fait être très circonspect dans l'interprétation, pour deux raisons que nous allons étudier successivement :

- l'activité spécifique du pool des précurseurs,
- la distinction entre les divers types de cellules.

a - Activité spécifique du "pool" nucléotidique

L'hypophyse répond à la castration par une élévation de la quantité de RNA et de DNA, mais l'augmentation de RNA est plus forte, donc le rapport RNA/DNA croît. Ceci signifie qu'une cellule considérée a besoin d'une quantité plus importante de précurseurs lorsque l'animal a été castré ; il en résulte que, pendant la durée de l'incubation, il a pu se former plus d'acide orotique endogène que chez l'animal normal. Etant donné que la pénétration de l'acide orotique - ^{14}C exogène est voisine pour les deux types d'animaux, il y a une plus grande dilution du précurseur radioactif par le précurseur endogène, d'où une activité spécifique du pool des nucléotides uridyliques plus faible pour les castrés.

.../...

Globablement, même si la biosynthèse du RNA est plus importante chez les animaux gonadectomisés, ce phénomène peut être masqué par la diminution d'activité spécifique du pool des nucléotides. Dans l'état actuel de nos expériences, nous ne pouvons pas connaître cette activité spécifique.

b - Distinction des types de cellules

Il est évident que l'adénohypophyse est composée d'un certain nombre de cellules qui ont des fonctions différentes (secrétion de LH, FSH, TSH, prolactine ...). La castration doit produire un effet sur les cellules gonadotropes (stimulation de la secrétion de LH et FSH par l'intermédiaire des releasing factors hypothalamiques, LRF et FRF) et peut être aucun effet (ou un effet différent) sur les autres types de cellules. Du point de vue biosynthèse du RNA, la gonadectomie peut éventuellement se traduire par une stimulation dans une cellule donnée et une inhibition dans une autre. Nos expériences réalisées par incubation de glandes entières ne nous permettent pas de conclure, car nous n'observons qu'un phénomène global. A l'appui de cette hypothèse, nous pouvons mentionner les travaux autoradiographiques de VERTES et collaborateurs (1968) et de STÄDTLER et collaborateurs (1969, 1970). Les premiers auteurs constatent in-vivo une incorporation plus importante d'uridine dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse des animaux castrés et une diminution dans les cellules acidophiles. Le second groupe observe une augmentation de l'incorporation de cytidine également dans les gonadotropes (RNA nucléaire) et une diminution dans les thyréotropes pour les autres types de cellules, l'augmentation est plus faible. Dans une étude globale in-vitro en présence d'uridine, SALAMAN (1970) n'observe pas de modification d'activité spécifique du RNA isolé entre rats normaux et castrés.

Il résulte de ces observations que nous ne pouvons pas exclure une éventuelle modification de la biosynthèse du RNA, mais que pour l'observer, il faudrait pouvoir travailler sur des types de cellules isolées avant l'incubation.

R E S U M E

Notre travail constitue une contribution à l'étude de l'influence de la testostérone sur le développement de l'adénohypophyse du rat mâle et de l'effet de la castration sur la biosynthèse "de novo" des nucléotides uridyliques et du RNA dans cette glande.

La première partie de nos recherches a permis de montrer que l'injection journalière de doses faibles (0,025 à 0,100 mg/jour) ou élevées (0,5 à 2,0 mg/jour) de propionate de testostérone à des rats impubères de 4 jours ou de 23 jours n'inhibe pas, d'une manière significative, le développement de l'adénohypophyse. Ces résultats ont été obtenus soit par simple pesée de l'organe, soit par les dosages systématiques de DNA, RNA et protéines.

L'action de l'hormone se fait par contre sentir au niveau des organes sexuels. Après injection pendant 30 jours, les testicules sont atrophiés, le degré d'atrophie n'étant pas proportionnel à la dose injectée. A la suite de ces mêmes séries d'injection, les vésicules séminales s'hypertrophient, et cette hypertrophie est d'autant plus grande que la dose est importante. Ces résultats obtenus avec les organes sexuels confirment donc un certain nombre d'observations précédentes.

La castration du rat mâle se traduit par une hypertrophie de l'adénohypophyse. Cette hypertrophie est décelée aussi bien par pesée de la glan de que par dosage des protéines et du RNA. Il se produit également un phénomène d'hyperplasie, étant donné que la quantité de DNA augmente faiblement. Après castration, les vésicules séminales sont par contre considérablement atrophiées.

.../...

L'injection ultérieure de propionate de testostérone à des rats castrés bloque complètement l'hyperplasie et l'hypertrophie de l'adénohypophyse. Elle permet également de ramener à la valeur normale le poids des vésicules séminales. L'étude de doses croissantes d'hormone nous a permis de déterminer une dose minimum qui est comprise entre 80 et 100 µg/jour aussi bien pour l'hypophyse que les organes sexuels.

La testostérone est donc capable de bloquer un hyper-développement de l'adénohypophyse, mais pas sa croissance normale.

La seconde partie de notre travail a permis de déterminer le contenu total en eau et le volume extracellulaire de l'adénohypophyse de rats mâles impubères et adultes, normaux et castrés. Nous n'avons trouvé aucune différence entre ces 4 catégories d'animaux. Nous avons donc retenu que, après incubation, l'eau totale représente 81,8 % du poids de la glande. L'incubation d'hypophyse en présence d'inuline $-^{14}C$ a permis d'estimer un espace extracellulaire égal à 27,8 % du poids de tissu humide.

Nous nous sommes attachés, au cours de la troisième partie de notre travail, à déterminer le rôle de précurseur de l'acide orotique dans la biosynthèse du RNA de l'adénohypophyse. Cette étude a été réalisée sur des rats impubères et adultes, normaux et castrés. Les comparaison entre séries étaient facilitées du fait de l'identité des valeurs de l'espace extra et intra-cellulaire. Nous montrons que l'acide orotique pénètre faiblement dans les cellules (plus faiblement que l'uridine), mais que dès sa pénétration, il s'intègre à la voie de synthèse "de novo" des nucléotides uridyliques et cytidyliques. Il est immédiatement transformé en orotidine-5' phosphate ⟶ uridine -5'-phosphate ⟶ uridine -5'-diphosphate ⟶ uridine-5' triphosphate ⟶ uridine diphosphoglucose + cytidine -5'-triphosphate. L'UTP et le CTP sont alors incorporés dans le RNA.

.../...

Cette chaîne métabolique ne semble altérée ni par l'âge de l'animal ni par la castration. Les proportions des divers composés sont identiques pour les rats des 4 séries. L'activité spécifique du RNA est également la même, mais nous ne pouvons cependant pas en conclure que la castration n'affecte pas sélectivement la biosynthèse du RNA dans les divers types de cellules de l'adénohypophyse.

B I B L I O G R A P H I E

- ARAI, Y. et MASUDO, S. (1968) : Endocr. Japon . 15 , 375
- BERKALOFF, A. , BOURGUET, J. , FAVARD, P. , GUINNEBAULT, M. (1967) : Biologie et physiologie cellulaire. Ed. Hermann Paris (1967) - 223
- BOURKE, R.S. , and TOWER, D.B. (1966) : J. Neurochem. , 13 , 1071
- BOYD, T. et JOHNSON, D.C. (1968) : Acta Endocrinol. , 58 , 600
- BRAY, C.A. (1960) : Anal. Biochem. , I , 279
- BRINDEAU, HINGLAIS, H. et HINGLAIS, M. (1968) : presse médicale, 47, 281
- CHARGAFF, E. et ZAMENHOF, S. (1948) J. Biol. chem. 173, 327
- COHEN, R.S., BLASBERG, R. , LEVI, G. , and LAJTHA, A. (1968) ; J. Neurochem. 15, 707
- CUTULY, E. , Mc. CULLAGH, D.R. , et CUTULY, E. (1938) : Am. J. Physio. 121, 786
- DES GOUTTES, M.N. (1964) : C.R. Soc. Biol. , 158 , 1260
- DHOM, G. et STOCKER, E. (1964) : Experientia , 20 , 384
- FADIAL, J.B. , FREGLY, M.D. , et STRAW, J.A. (1967) : Texas Rep. Biol. Med., 25, 251
- GIESE, A.C. (1968) : Cell physiology, 3rd édition - Philadelphia, London, Toronto, W.B. Saunders co., 1968 , 290
- GREEP, R.O. et JONES, I.C. (1959) : Acad. Press, 5 , 197
- HINGLAIS H. et M (1950) : C.R. Soc. Biol. 144 , 903

.../...

- IRARASHI, M. , NALLAR R. et Mc CANN, S.M. (1964): Endocrinology, 75, 901

- JOHNSON, D.C. et WITSCHI, E. (1963) : Acta Endocrinol, 44 , 119

- JOHNSON, D.C. , YASUDA, M. et SRIDHARAN, B.N. (1964) ; J. Endocrinol, 29, 95

- J. KRAISER et S.C. CHENG (1968) : Am. J. Physiol. , 214 ; 158

- KURCZ, M. , HORN, G. , et MADERSPACH, K. (1969) : Acta Biol. Acad. Sc. Hung, 20, 389

- LEVI, G. (1969) : Analytical Biochemistry, 32 , 348

- LEVI, G. and LATTES, M.G. (1970) : J. Neurochem , 17 , 587

- LEWRY, O.H. , ROSEBROUGH, N.J. , FARR A.L. et RANDALL, J.R. (1951) : J. Biol Chem. , 193 , 265

- Mc=CANN, S.M. , DHARIWAL, A.P.S. et PORTER, J.C. (1968) : Ann. Rev. Physiol., 30 , 589

- Mc CANN, S.M. , TALEISNIK, S. et FRIEDMAN, H.M. (1960) : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. , 104 , 432

- REED, D.J. and WOODBURY, D.M. (1964) : Arch. Neurol. , 10 , 604

- ROSENBERG, L.E. , BLAIR, A. and SEGAL, S. (1961) : Biochim. Biophys. Acta, 54 , 479

- RUDOLPH, G.G. , et SAMUELS, L.T. (1949) : Endocrinology , 44 , 190

- SALAMAN , D.F. (1970) : J. Endrocrinol, 48 , 125

- SCHMIDT, G. and THANN HAUSER, S.J. (1945) : J. Biol. Chem. 161 , 93

- V. SCHREIBER, V. et KMENTOVA, V. (1965) : Physiol. Bohemoslov, 14 , 332

- SMITH, P.E. (1926) : Anat. Rec. , 32 , 221

- STÄDLER, F. , STÖCKER, E. , DHOM, G. et TIETZE H.U. (1970) : Acta Endocrinol 64, 324

- STÄDLER, F. , STÖCKER, E. et TIETZE, H.U. (1969) : Acta Endocrinol Suppl., 138, 199

.../...

- SWANSON, H.E. et VAN DER WERFF TEN BOSCH, J.J. (1964) : Acta Endocrinol , 47 , 37

- SWANSON, H.E. et VAN DER WERFF TEN BOSCH, J.J. (1965) : Acta Endocrinol, 50 , 310

- TATA, J.R. (1966) : Progr. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. , 5 , 191

- TONOUE, T. et YAMAMOTO, R. (1967) : Endocrinology, 81 , 101

- VALOTAIRE, Y. et DUVAL, J. (1968) : Bull. Soc. Chim. Biol. , 51 , 1233

- VALOTAIRE, Y. , DUVAL, J. , JOUAN, P. (1969) : Bull. Soc. Chem. Biol. , 51, 211

- VALOTAIRE, Y. , et DUVAL,J. (1970) : Biochim, Biophys. , Acta , 224 , 63-73

- VERNADAKIS, A. and WOODBURY, D.M. (1965) : Arch. Neurol. , 12 , 284

- WOODWARD D.L. , REED, D.J. and WOODBURY, D.M. (1967) : Am. J. Physiol. 212, 367

- ZAGINUMA, T. , MATSUDA, A. , MURASAWA, Y. , KOBAYASHI, T. et KOBAYASHI, T. (1969) : Endocrinol Japon , 16 , 5

- TEMP, J.W. et WILSON, J.E. (1965) : Fédération Proceedings, 24 , 664

A B R E V I A T I O N S

F.S.H.	: Follicle - stimulating hormone = hormone folliculo-stimulante.
F.R.F.	: FSH - releasing factor.
L.H.	: Luteinizing hormone : hormone lutéinisante
L.R.F.	: Lutenizing hormone : releasing factor.
T.P.	: propionate de testostérone
T.S.H.	: Thyrotropin = hormone thyréotrope.
cpm	: coups par minutes
dpm	: désintégrations par minutes
RNA	: acide ribonucléique
DNA	: acide désoxyribonucléique
O	: acide orotique
OMP	: orotidine 5' - phosphate
U	: uracile
Ur	: uridine
UMP	: uridine 5' - mono phosphate
UDP	: uridine 5' - diphosphate
UDPG	: uridine diphosphate glucose
UTP	: uridine 5' - triphosphate

TABLE DES MATIERES

	PAGES
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE - EFFET DE LA TESTOSTERONE SUR LES RATS NORMAUX ET CASTRES	4
I - INTRODUCTION	5
II - PARTIE EXPERIMENTALE	7
1 - Matériel et protocole expérimental	7
2 - Traitement des organes	9
3 - Techniques de dosages	12
a - Protéines 1) Principe 2) Réactifs 3) Dosage	12
b - RNA 1) Principe 2) Etalonnage 3) Dosage	13
c - DNA 1) Principe 2) Etalonnage 3) Dosage	15
III - RESULTATS	17
1 - Effet du TP sur les rats normaux	17
a - Poids corporel	
b - Adénohypophyse	
c - Testicules	
d - Vésicules séminales	
2 - Effet de la castration et de l'injection ultérieure d'hormone	21
a - Série 1	
b - Série 2	
c - Série 3	

.../...

PAGES

IV - DISCUSSION ET CONCLUSIONS 27

1 - Effet de l'hormone sur les rats normaux 27

2 - Effet de la castration et de l'injection ultérieure d'hormone 29

PAGES

DEUXIEME PARTIE - DETERMINATION DE L'ESPACE EXTRACELLULAIRE DES HYPOPHYSES DES RATS NORMAUX ET CASTRES

I - INTRODUCTION 36

II - MATERIEL ET METHODES 39

1 - Traitement des animaux 39

2 - Prélèvement des hypophyses et incubation 40

a - Incubation sans inuline, pour la détermination du volume d'eau totale

b - Incubation avec inuline

3 - Détermination du volume d'eau totale 41

4 - Détermination du volume d'eau extracellulaire 42

a - Préparation de la fraction acido-soluble

b - Détermination de la radioactivité

5 - Calculs 43

a - Volume d'eau totale

b - Volume extracellulaire

c - Calculs statistiques

III - RESULTATS 45

1 - Volume d'eau totale 45

2 - Volume d'eau extracellulaire 45

IV - DISCUSSION ET CONCLUSIONS 47

1 - Résultats 47

2 - Critique méthodologique 48

a - Pureté de l'inuline

b - Prélèvement et essuyage des hypophyses

c - Quantité de radioactivité extracellulaire faible.

PAGES

TROISIEME PARTIE - INCORPORATION DE L'ACIDE OROTIQUE ^{14}C DANS LE RNA de l'ADENOHYPOPHYSE DE RAT 56

I - INTRODUCTION 57

II - MATERIEL ET METHODES 59

1 - Animaux 59

2 - Acide orotique ^{14}C 59

3 - Séries d'expériences 60

a - Etude générale

b - Etude de la fraction acidosoluble : pourcentage des différents dérivés

c - Etude de la fraction RNA : proportion UMP - ^{14}C et CMP - ^{14}C

4 - Prélèvement de l'hypophyse et incubations 61

5 - Extraction et hydrolyse 61

6 - Chromatographie et électrophorèses 62

a - Essais de séparation de l'acide orotique et des dérivés uridyliques par électrophorèse à haute tension

b - Essais de séparation par chromatographie

c-- Techniques retenues pour les différentes analyses

7 - Détermination de la radioactivité 63

a - Etude générale

b - Contrôle des fractions S et RNA.

III - RESULTATS

1 - Analyse de l'acide orotique 64

2 - Séparation de l'acide orotique et des différentes dérivés 64

a - Electrophorèse

b - Chromatographie

3 - Incorporation de l'acide orotique dans l'adénohypophyse en fonction de la concentration dans le milieu d'incubation 68

../...

PAGES

4 - Incorporation de l'acide orotique en fonction de la durée d'incubation 70

a - Pénétration dans l'hypophyse

b - Incorporation dans le RNA

c - Incorporation dans le DNA

5 - Analyse de la fraction acido-soluble Transformation de l'acide orotique 78

6 - Analyse du RNA synthétisé en cours d'incubation 82

IV - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1 - Comparaison acide orotique-uridine 83

2 - Comparaison rats impubères - rats adultes 84

3 - Comparaison rats témoins - rats castrés 85

a - Activité spécifique du "pool" nucléotidique

d - Distinction des types de cellules

RESUME - 87

BIBLIOGRAPHIE - 90

ABREVIATIONS - 93

TABLE DES MATIERES - 94

VU :
Le Président de la Thèse

VU :
Le Directeur de Thèse

VU et APPROUVE
RENNES, le

Le Directeur de l'U.E.R.

VU et PERMIS D'IMPRIMER

RENNES, le

Le Président de l'Université de RENNES

C. CHAMPAUD